

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**Trayectorias evolutivas de las mutaciones que
confieren resistencia a gentamicina en
*Escherichia coli***

Tesis Doctoral

Claudia Jimena Ibacache Quiroga
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)
Madrid, 2015.

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**Trayectorias evolutivas de las mutaciones que
confieren resistencia a gentamicina en
*Escherichia coli***

Memoria presentada por:
Claudia Jimena Ibacache Quiroga
para optar al título de Doctor en Microbiología por la Universidad
Autónoma de Madrid.

Director de Tesis:
Dr. Jesús Blázquez Gómez

A mi familia

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Blázquez por dirigir este trabajo y recibirme en su laboratorio, por la confianza depositada en mí durante estos años, por la ayuda y por el apoyo brindados para poder realizar este trabajo.

Al Dr. Rafael Rivilla, tutor de esta tesis, por el apoyo y colaboración durante todo este tiempo.

A todo el personal y miembros del CNB que hicieron posible este trabajo. Gracias a todos los que contribuyeron durante estos cuatro años.

Al Dr. Fernando Rojo y al Dr. José Luis Martínez por estar siempre dispuestos a ayudarme, sobre todo durante los últimos años. Gracias por darme todas las facilidades para quedarme en el CNB y que este trabajo llegara a su término.

Al Dr. Alejandro Dinamarca, por toda la ayuda y el apoyo brindados durante este tiempo, incluso a la distancia. Por recibirme en su laboratorio y permitirme desarrollar parte de este trabajo ahí, y por la disposición y paciencia para ayudarme cada vez que lo necesité.

Al antiguo 211, en especial, a Coloma, Noelia y Thuy. Sin ustedes tres seguro que la llegada habría sido más difícil. Gracias por acompañarme en los primeros años, y por hacer que cada vuelta desde casa fuera un poco menos difícil. También quisiera agradecer a Carmen y a Jas, con quienes siempre he podido contar.

A los chicos del 212 y del 216 por adoptarme. Han hecho que estos años en el CNB sean mucho más llevaderos. A Luis, Sofía, Ruggero, Renata, Dione, Ema, Sara, Alejandra, Felipe, Blanca, Manuel y Fernando, sinceramente, gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme. Por haberme recibido y acompañado durante estos últimos años.

A Sandra y Rolando, por hacerme sentir siempre un poco menos lejos de casa. Por darme un trozo de Chile a este lado del mundo.

A mis amigos, que, a pesar de la distancia, me han acompañado, apoyado y comprendido siempre.

A mis padres y mis hermanas, que han estado conmigo siempre. Gracias por la ayuda incondicional, por mostrarme siempre la cara más amable de la vida y por apoyar siempre mis decisiones.

A mi familia por el amor, el apoyo y la ayuda incondicional durante estos cuatro años. Por creer siempre en mí, por darme la energía y la fuerza necesarias para seguir adelante, cada vez que las mías fallaban. Gracias por no hacer de la distancia un obstáculo y por haberme acompañado siempre, en las buenas y en las malas. Gracias, por ayudarme siempre a tener los pies en la tierra y por alentarme a ser cada día mejor. Sin ella, ni estos años lejos, ni este trabajo hubiesen sido posible.

Esta tesis doctoral se llevó a cabo en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), gracias a una beca para estudios de doctorado en el extranjero del programa BecasChile 72110933, Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Gobierno de Chile.

Índice

Resumen.....	1
Resumen.....	3
Abstract	5
Lista de Abreviaturas.....	7
Introducción.....	11
1.1 Evolución y variabilidad genética.....	13
1.2 Antibióticos y desarrollo de resistencia.....	16
1.2.1. Aminoglicósidos: Mecanismo de acción y resistencia.....	21
1.2.2 Gentamicina como modelo de estudio de resistencia a antibióticos aminoglicósidos	24
1.3 <i>Escherichia coli</i> Δ<i>dnaQ</i> como modelo de estudio para el desarrollo de resistencia a gentamicina	27
Objetivos	31
Metodología.....	35
3.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.....	37
3.2 Ensayo de evolución y selección de cepas resistentes.....	39
3.3 Perfil de sensibilidad a antimicrobianos	40
3.4 Perfil hemolítico	40
3.5 Formación de biofilm.....	40

3.6 Frecuencia de mutantes	41
3.7 Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno.....	41
3.8 Caracterización metabólica y bioquímica.....	42
3.9 Morfología celular.....	42
3.10 Crecimiento bacteriano	42
3.11.1 Técnicas generales	42
3.11.2 PCR.....	43
3.11.3 Transformación bacteriana	43
3.12 Secuenciación de DNA genómico.....	43
3.13 Trayectorias evolutivas.....	44
3.14 Construcción de cepas <i>E. coli</i> mutantes.....	44
3.15 Ensayo de evaluación de estrés oxidativo.....	45
3.16 Efecto sobre la transcripción de <i>recA</i>	45
 Resultados	 49
 4.1 Evolución de <i>Escherichia coli</i> hacia la resistencia a Gentamicina.....	 51
4.2 MG1655	54
4.2.1 Caracterización fenotípica de colonias aisladas desde proceso de evolución	54
4.2.1.1 Sensibilidad a antimicrobianos.....	54
4.2.1.2 Hemólisis	56
4.2.1.3 Formación de biofilm	57
4.2.2 Caracterización fenotípica de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina seleccionadas: CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M.	58
4.2.2.1 Frecuencia de mutantes	58
4.2.2.2 Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno	59
4.2.2.3 Perfil metabólico	60
4.2.2.4 Análisis enzimático	61

4.2.2.5 Crecimiento bacteriano.....	62
4.2.2.6 Morfología celular.....	63
4.2.3 Caracterización genotípica de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina seleccionadas: CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M.....	65
4.2.3.1 Mutaciones comunes.....	66
4.3 $\Delta dnaQ$.....	72
4.3.1 Caracterización fenotípica de colonias aisladas desde proceso de evolución	72
4.3.1.1 Sensibilidad a antimicrobianos	73
4.3.1.2 Hemólisis	75
4.3.1.3 Formación de biofilm	76
4.3.2 Caracterización fenotípica de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina seleccionadas: CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J.....	78
4.3.2.1 Frecuencia de mutantes.....	78
4.3.2.2 Sensibilidad a peróxido de hidrógeno	78
4.3.2.3 Perfil metabólico.....	79
4.3.2.4 Perfil Enzimático.....	80
4.3.2.5 Crecimiento bacteriano.....	81
4.3.2.7 Morfología celular.....	82
4.3.3 Caracterización genotípica de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina seleccionadas: CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J.....	84
4.3.3.1 Mutaciones comunes.....	88
4.4 Mutaciones comunes en las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655 y $\Delta dnaQ$	92
4.5 CIM8M como modelo de resistencia a gentamicina.....	94
4.5.1 Evaluación de la sensibilidad de CIM8M a aminoglicósidos.....	95
4.5.2 Ensayo de complementación cepa CIM8M.....	96
4.5.3 Efecto de las mutaciones comunes sobre las variaciones en la sensibilidad a antibióticos de la cepa CIM8M.....	98
4.5.4 Evaluación del efecto de las mutaciones presentes en CIM8M sobre la resistencia a gentamicina.....	99

4.5.5 Evaluación del efecto de la complementación de las cepas mutantes en <i>fhuA</i> , <i>fusA</i> y <i>potA</i> sobre el crecimiento bacteriano y la sensibilidad a gentamicina	101
4.5.6 Estimación de la contribución de las mutaciones en <i>atpG</i> y <i>cyoA</i> a la resistencia a gentamicina	107
4.5.7 Efecto de las mutaciones individuales presentes en CIM8M sobre la sensibilidad a cloranfenicol	107
4.5.8 Sensibilidad a estrés oxidativo	108
4.5.9 Activación del sistema SOS.....	110
Discusión	113
5.1 Evolución bacteriana hacia la resistencia a gentamicina	115
5.2 Desarrollo y selección de fenotipo hipermutador	116
5.3 Resistencia a gentamicina en <i>Escherichia coli</i>	117
5.3.1 Síntesis proteica	117
5.3.2 Transporte de hierro	118
5.3.3 Metabolismo energético	119
5.3.4 Transporte de espermidina	121
5.4 Modificación de los perfiles de sensibilidad a antibióticos	122
5.5 Estrés oxidativo	123
Conclusiones	127
Bibliografía	131
Anexos	159

Índice de Figuras

Figura 1. Sitios diana de las principales familias de antibióticos.....	18
Figura 2. Estructura base de los antibióticos aminoglicósidos con sustituciones 4,6- ..	22
Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de la gentamicina en <i>E. coli</i>	26
Figura 4. Frecuencia de mutantes de cepas ancestrales en rifampicina.....	51
Figura 5. Formación del biofilm de las cepas derivadas de MG1655.	58
Figura 6. Frecuencia de mutantes de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas	59
Figura 7. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas	60
Figura 8. Metabolización de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas	61
Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.	62
Figura 10. Morfología celular de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.....	64
Figura 11. Esquema de la biosíntesis, metabolismo y rol de espermidina	71
Figura 12. Formación del biofilm de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$	77
Figura 13. Frecuencia de mutantes para resistencia a rifampicina de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	78
Figura 14. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	79

Figura 15. Metabolización de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	80
Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	81
Figura 17. Morfología celular de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	83
Figura 18. Esquema de las mutaciones comunes en las cepas resistentes a gentamicina y sus trayectorias evolutivas.....	93
Figura 19. Estructura de las proteínas mutantes en CIM8M	95
Figura 20. Curvas de crecimiento de la cepa CIM8M complementada.....	97
Figura 21. Curvas de crecimiento de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208.....	100
Figura 22. Curvas de crecimiento de FhuA197 complementada	103
Figura 23. Curvas de crecimiento de EFG593 complementada.....	104
Figura 24. Curvas de crecimiento de PotA208 complementada.....	106
Figura 25. Estrés oxidativo de las cepas MG1655 y CIM8M complementadas	109
Figura 26. Estrés oxidativo de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208.....	109
Figura 27. Estrés oxidativo de las cepas JW3711 y JW0422.....	110
Figura 28. Efecto sobre la transcripción de <i>PrecA::GFP</i>	111

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas durante este estudio.....	37
Tabla 2. Plásmidos utilizados durante este estudio.....	38
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados durante este estudio.	39
Tabla 4. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas ancestrales	52
Tabla 5. Cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina.	54
Tabla 6. Variación de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655	55
Tabla 7. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.	56
Tabla 8. Perfil de hemólisis de las cepas derivadas de MG1655.....	57
Tabla 9. Capacidad metabólica de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.....	61
Tabla 10. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. ..	63
Tabla 11. Mutaciones en las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.....	65
Tabla 12. Mutaciones comunes en las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.	66
Tabla 13. Cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina	73
Tabla 14. Variación de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$	74

Tabla 15. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas.	75
Tabla 16. Perfil de hemólisis de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$	76
Tabla 17. Capacidad metabólica de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	80
Tabla 18. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	82
Tabla 19. Mutaciones en las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas	84
Tabla 20. Mutaciones comunes en las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas.....	87
Tabla 21. Trayectorias evolutivas de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas: mutaciones comunes	93
Tabla 22. Mutaciones en cepa CIM8M	94
Tabla 23. Concentraciones mínimas inhibitorias de aminoglicósidos de CIM8M	96
Tabla 24. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina en la cepa CIM8M complementada.	96
Tabla 25. Tiempos de duplicación de CIM8M complementada	98
Tabla 26. Concentraciones mínimas inhibitorias de fosfomicina y trimetoprim en CIM8M complementada	99
Tabla 27. Características de las cepas mutantes en los genes <i>fhuA</i> , <i>fusA</i> y <i>potA</i>	100
Tabla 28. Tiempos de duplicación de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208.	101
Tabla 29. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208 complementadas	101

Tabla 30. Tiempos de duplicación de FhuA197 complementada.....	103
Tabla 31. Tiempos de duplicación de EFG593 complementada	105
Tabla 32. Tiempos de duplicación de PotA208 complementada.....	106
Tabla 33. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina de mutantes en genes <i>atpG</i> y <i>cyoA</i>	107
Tabla 34. Concentraciones mínimas inhibitorias de cloranfenicol de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208.	108
Tabla A1. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de MG1655	A3
Tabla A2. Perfil metabólico de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas	A4
Tabla A3. Actividad enzimática de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas.....	A7
Tabla A4. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$...	A8
Tabla A5. Perfil metabólico de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas.....	A9
Tabla A6. Actividad enzimática de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas.	A13

Resumen

Resumen

La resistencia a antibióticos es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia a nivel mundial. Si bien la introducción de estos fármacos en la práctica clínica significó uno de los mayores hitos de la medicina moderna, el aislamiento de cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos disponibles hoy en día ha hecho que la efectividad de estas terapias disminuya de manera significativa, aumentando la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones bacterianas, y los gastos en prestaciones de salud. En la actualidad se ha estimado que sólo en Europa se producen 25.000 muertes al año a causa de patógenos multirresistentes a antibióticos. Entre los antibióticos de relevancia clínica se encuentra la familia de los aminoglicósidos. Estos son de especial importancia para el tratamiento de patologías infecciosas causadas por microorganismos gram negativos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, el desarrollo de resistencia a estos compuestos ha disminuido su eficacia. Si bien el principal mecanismo de resistencia para estos antibióticos se basa en su modificación enzimática, se ha establecido también que es posible la generación de resistencia mediante mutaciones. Distintos estudios han evaluado el desarrollo de resistencia a aminoglicósidos, no obstante, la utilización de gentamicina como presión de selección no se ha estudiado con anterioridad. El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar la evolución bacteriana hacia la resistencia a gentamicina, cuya utilización se restringe casi en su totalidad al uso intrahospitalario. Como modelo de estudio se utilizaron dos fenotipos bacterianos de *E. coli*; b b la cepa MG1655, con fenotipo normomutador y su derivada hipermutadora $\Delta dnaQ$. El proceso evolutivo de ambas cepas se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico como única presión de selección. Para esto se utilizaron cultivos continuos del tipo quimiostato, que permitieron mantener constante la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento bacteriano, así como también las condiciones óptimas para el ingreso del antibiótico a la célula.

A partir del ensayo de evolución se aislaron un total de sesenta cepas bacteriana resistentes a altas concentraciones de gentamicina ($\geq 512 \mu\text{g/ml}$). La caracterización en profundidad de ocho de ellas permitió establecer que todas estas cepas presentan mutaciones en los genes *fusA* y *fhuA*, y en los operones *atp*, *cyo* y *potABCD*. Estos resultados sugieren que, además de una alteración en la traducción mediada por mutaciones en el Factor de Elongación G, la resistencia a gentamicina se encuentra asociada a alteraciones en el metabolismo energético de la célula y la disminución del ingreso del antibiótico a la misma. Estas mutaciones comunes no generan resistencia a antibióticos pertenecientes a otras familias estructurales. Los resultados obtenidos permiten inferir que la resistencia a gentamicina en estas cepas se encuentra determinada por un conjunto de mutaciones, en lugar de obedecer a una única mutación. De esta manera, las mutaciones actuarían de manera colaborativa, incrementando la resistencia a estos antibióticos. También ha sido posible establecer que esta resistencia no se encuentra mediada por un aumento en la resistencia a estrés oxidativo, ya que todas las cepas seleccionadas presentan un aumento en la sensibilidad a agentes oxidantes.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the main problems in public health worldwide. The introduction of these compounds into medical practice was one of the most relevant milestones of modern medicine. Nevertheless, the isolation of resistant pathogens and the spread of resistant determinants among microorganisms have made these pharmacological therapies ineffective, increasing mobility and mortality related to infectious diseases. Nowadays, only in Europe, 25,000 patients die from multiresistant bacterial infections per year. Among most important antibiotics in human health are those that belong to the aminoglycoside family, whose are effective for the treatment of infections caused by gram negative pathogens like *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. These antibiotics have not been the exception for the development and spread of resistance, and enzymatic modification has been described as the main resistance mechanism for these compounds, nevertheless, mutations have also been associated to the development of resistance to aminoglycosides. Gentamicin is an aminoglycoside used for the treatment of infectious diseases caused by gram negative pathogens mainly in health care facilities. Development of resistance of other aminoglycosides has been previously studied but no evaluation with gentamicin as selective pressure has been done. The aim of this work was to study bacterial evolution into gentamicin resistance of two different *E. coli* phenotypes, in presence of increasing concentrations of the antibiotic. The strains evaluated in this study were MG1655, a wild type phenotype, and $\Delta dnaQ$, a mutator phenotype derived from MG1655. Both strains were evolved in continuous cultures in order to maintain culture conditions constant as well as growth rate, which is related to aminoglycoside uptake. In this scenario, gentamicin concentration acts as the main selective pressure.

From these evolution assays, sixty bacterial strains highly resistant to gentamicin (≥ 512 $\mu\text{g/ml}$) were isolated and characterized. Four strains from each ancestral strain were selected and further characterized, phenotypically and molecularly. Results indicate that the eight selected strains have mutations in *fhuA* and *fusA*, and in the *atp*, *cyo* and *potABCD* operons. These results suggest that gentamicin resistance in the selected strains is related to protein synthesis, energetic metabolism and antibiotic uptake. No relation between gentamicin resistance and oxidative stress was observed in this work.

Results obtained in this study indicate that the mechanism of resistance to aminoglycoside in *E. coli* is not based on one mutation, but in the cooperative effect of different mutations for the development of this phenotype.

Lista de Abreviaturas

µg: microgramo
µl: microlitro
ml: mililitro
l: litro
min: minutos
h: horas
µ: velocidad de crecimiento
F: flujo
D: dilución
TMR: tiempo medio de residencia
Abs: absorbancia
nm: nanometro
mm: milimetro
CMI: concentración mínima inhibitoria
AMP: ampicilina
GEN: gentamicina
AMK: amikacina
KAN: kanamicina
CIP: ciprofloxacino
COL: colistina
CMF: cloranfenicol
FOS: fosfomicina
TET: tetraciclina
RIF: rifampicina
TRI: trimetoprim
BEt: bromuro de etidio
LB: medio Luria Bertani.
°C: grados Celsius
MMR: del inglés Mismatch Repair System o sistema de reparación de emparejamiento erróneo.
SNP: del inglés Single Nucleotide Polymorphism o polimorfismo de nucleótido simple
EDPI y II: del inglés Energy Dependent Phase I y II o fase dependiente de energía I y II.
SCV: del inglés Small Colony Variant o fenotipo de colonia pequeña
EF-G: del inglés Elongation Factor G o factor de elongación G.
DNA: del inglés deoxyribonucleic acid o ácido desoxiribonucleico
RNA: del inglés ribonucleic acid o ácido ribonucleico
tRNA: RNA de transferencia
mRNA: RNA mensajero
ATP: adenosin trifosfato

ADP: adenosin difosfato
AMPc: adenosin monofosfato cíclico
ABC: del inglés ATP binding cassette o casete de unión a ATP
NDH-I: NADH deshidrogenasa I
PCR: del inglés polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa
T_m: del inglés melting temperature o temperatura de fusión.
rpm: revoluciones por minuto
A: alanina
R: arginina
N: asparagina
D: ácido aspártico
C: cisteína
Q: glutamina
E: ácido Glutámico
G: glicina
H: histidina
I: isoleucina
L: leucina
K: lisina
M: metionina
F: fenilalanina
P: prolina
S: serina
T: treonina
W: triptófano
Y: tirosina
V: valina
IIGM: Segunda Guerra Mundial
INS: inserción
DEL: delección
cml: cambio en el marco de lectura
ROS: del inglés reactive oxygen species o especies reactivas del oxígeno
TCA: del inglés tricarboxylic acid o ácido tricarboxílico

Introducción

1 Introducción

1.1 Evolución y variabilidad genética

La evolución se define como el cambio en una línea de descendencia a lo largo del tiempo para dar origen a la producción de una nueva especie o variedad (Madigan, Martinko, & Parker, 2003). Este concepto, que en la actualidad ha sido ampliamente estudiado en organismos eucariotas y procariotas, fue introducido a comienzos del siglo XIX por el naturalista francés Jean-Baptiste Lamarck. Entre los postulados de Lamarck se encuentra la teoría de que los organismos provenían de la materia inerte, la cual, mediante perfeccionamientos, aumentaba su grado de complejidad, dando origen así a nuevas especies. Lamarck postuló también la teoría de *uso/desuso*, en la cual planteaba que aquellas partes de cuerpo y/o funciones biológicas que no fueran utilizadas por los organismos desaparecerían, mientras que aquellas que fuesen utilizadas constantemente se perfeccionarían (Lamarck, 1809). A pesar de ser este naturalista francés quien introdujo el concepto de evolución, fue Charles Darwin quien, en 1859, dio origen a la teoría de la evolución más ampliamente conocida y aceptada hasta la actualidad. Las aportaciones de Darwin se basan, a modo muy general, en dos principales teorías. La primera hace referencia a que todas las especies existentes provienen de un ancestro común, mientras que la segunda plantea el concepto de selección natural. La selección natural se basa en que, si bien las variaciones fenotípicas son aleatorias, los organismos más aptos serán seleccionados en un ambiente determinado, perpetuándose así en el tiempo. De la misma manera, aquellos organismos que no hayan desarrollado estas características beneficiosas tenderán a la extinción (Darwin, 1859). Los postulados de Darwin y su teoría de la evolución surgieron mediante sus observaciones desarrolladas durante una expedición a Sudamérica, y son éstas las que han sentado las bases para el estudio de la evolución de las especies hasta nuestros días. El análisis de Darwin se basó únicamente en las características fenotípicas de las especies estudiadas, y fue a comienzos del siglo XX cuando se comenzó a establecer la relación entre variabilidad genética y evolución (Fisher, 1930).

Durante sus inicios, las teorías evolutivas consideraban, principalmente, organismos eucariotas, sin embargo, a principios del siglo XX comenzó a adquirir importancia el concepto de evolución bacteriana (Kligler, 1917). Debido a la característica haploide de estos microorganismos, la variabilidad genética producto de procesos evolutivos tiene un mayor impacto sobre su fenotipo, permitiendo así establecer la relación entre variación genotípica y fenotípica. Por otra parte, su reducido tiempo de duplicación en comparación con otros organismos permite el estudio de múltiples generaciones bacterianas en un período de tiempo acotado. Otra de las características que ha hecho del modelo bacteriano un objeto de estudio de tanto interés es la capacidad de estos microorganismos de colonizar y adaptarse a los diversos ecosistemas existentes. En la actualidad se han identificado bacterias capaces de colonizar y vivir en ambientes con condiciones de temperaturas, pH y salinidad extremas (M. Madigan, 2000; M. T. Madigan & Oren, 1999), así como también de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente nutricional (Gottschalk, 1986). En este contexto, las bacterias son consideradas un buen modelo para el estudio de los mecanismos

evolutivos, donde la teoría de selección natural expuesta por Darwin se ve reflejada tanto en el fenotipo como en el genotipo de los microorganismos en los distintos nichos ecológicos que habitan. La variabilidad genética de estos microorganismos se genera fundamentalmente mediante tres mecanismos: mutación, recombinación y transferencia horizontal.

1.1.1 Mutación. Las mutaciones son cambios en la secuencia de DNA producidos mediante sustitución de bases nitrogenadas conocida también como SNP, por su nombre en inglés *single-nucleotide polymorphism*, o mediante la inserción o delección de secuencias génicas (Arber, 2000). Las mutaciones pueden ser inducidas por agentes externos, ya sean físicos o químicos, sin embargo, una de las principales fuentes de mutaciones en la célula bacteriana lo constituye el proceso de replicación del DNA. Debido a la importancia de mantener la integridad del material genético, la célula bacteriana cuenta con diversos mecanismos para conservar la fidelidad durante la replicación. Entre éstos se encuentran el sistema de reparación de emparejamiento erróneo o MMR, del inglés *Mismatch Repair System*, y la subunidad ϵ de la DNA polimerasa III (Cox & Horner, 1983; Kelman & O'Donnell, 1995; Reha-Krantz, 2010; Scheuermann, Tam, Burgers, Lu, & Echols, 1983; Strauss, Sagher, & Acharya, 1997).

El sistema MMR permite la corrección de nucleótidos que han sido erróneamente emparejados durante la replicación del DNA. Este sistema, común tanto en procariotas como en eucariotas, permite la conservación de la fidelidad tras el proceso replicativo. Por su parte, la subunidad ϵ de la DNA polimerasa tiene por objetivo la detección y corrección de errores introducidos al DNA durante su replicación. Para ambos sistemas, mutaciones en los genes que codifican para las proteínas involucradas tienen por consecuencia un fenotipo hipermutador, pudiendo aumentar la frecuencia de mutantes de estos microorganismos en tres y cuatro órdenes de magnitud, respectivamente (Bayliss, Sweetman, & Moxon, 2004; Glickman & Radman, 1980; Reha-Krantz, 2010; Treffers, Spinelli, & Belser, 1954; Wu & Marinus, 1994). Además de errores introducidos durante la replicación, las mutaciones pueden ser producidas por agentes físicos como la luz ultra violeta (Yasui & McCready, 1998) y la radiación ionizante (rayos X) (Tatum, 1945), así como también por agentes químicos (Nishioka, 1975). Entre los agentes químicos de mayor importancia se encuentran las especies reactivas del oxígeno que, ya sea mediante la presencia de éstas en el ambiente o mediante su generación debido a procesos metabólicos, pueden inducir la generación de mutaciones en la célula bacteriana. Al incrementar los niveles de especies reactivas del oxígeno en la célula se generan numerosos tipos de bases nitrogenadas, entre las cuales 8-oxo-dGTP es de las más importantes. La oxidación de esta base nitrogenada permite que, en lugar de formar uniones con citosina, lo haga con una adenina, generando así un cambio en la secuencia de DNA. Para corregir estas mutaciones, la célula bacteriana cuenta con un sistema que permite escindir la base oxidada y evitar su efecto tóxico para la célula. En *Escherichia coli*, los genes involucrados en este proceso son *mutM* y *mutY* (Dempse & Harrison, 1994; Michaels, Cruz, Grollman, & Miller, 1992; Michaels, Tchou, Grollman, & Miller, 1992), sin embargo, también se ha establecido el rol de *mutT* en este proceso (Tajiri, Maki, & Sekiguchi, 1995), y, al igual que lo que ocurre con otros sistemas de reparación del DNA, la mutación o delección de estos genes

provoca un incremento en la frecuencia de mutantes (Cabrera, Nghiem, & Miller, 1988; Moriya & Grollman, 1993). Estos agentes físicos y químicos no sólo generan un daño directo en el DNA sino que también generan la activación del sistema de respuesta a estrés denominado sistema SOS. La activación de éste produce una respuesta celular generalizada, la cual implica la activación de múltiples genes en respuesta al daño en el DNA (Radman, 1975). Entre las respuestas observadas se encuentra la inducción de las enzimas DNA-polimerasas II, IV y V, las cuales presentan menor fidelidad durante la replicación. La baja fidelidad de estas enzimas permite la replicación del DNA a través de las lesiones producidas por la condición de estrés, pero es esta misma característica la responsable de inducir la mutagénesis durante la activación de este sistema (Napolitano, Janel-Bintz, Wagner, & Fuchs, 2000). No sólo las condiciones de estrés que generan un daño directo en el DNA incrementan la mutagénesis, también se ha detectado que condiciones de estrés relacionadas al metabolismo bacteriano, como la disponibilidad de nutrientes, pueden inducir el fenotipo hipermutador (Bjedov et al., 2003).

1.1.2 Recombinación. La recombinación corresponde al intercambio físico de elementos genéticos. Este proceso permite la reparación del DNA en determinadas condiciones y el reordenamiento génico cuando se trata de fragmentos de DNA propios del microorganismo. De tratarse de secuencias génicas diferentes, la recombinación dará lugar a un nuevo genotipo, pudiendo o no afectar el fenotipo bacteriano. Al igual que lo que ocurre con la mutación, la célula cuenta con mecanismos específicos para reducir la frecuencia de recombinación y mantener la fidelidad e integridad de su material genético (Arber, 2000; Didelot & Maiden, 2010). Uno de los mecanismos involucrados en este proceso es el sistema MMR, debido a la existencia de bases nitrogenadas mal apareadas durante el proceso de recombinación. De esta manera, cepas bacterianas mutantes en las proteínas del sistema MMR, además de aumentar la frecuencia de mutantes de las mismas, generan un incremento en la frecuencia de recombinación de secuencias con cierto grado de divergencia (Junop, Yang, Funchain, Clendenin, & Miller, 2003; Schofield & Hsieh, 2003). Actualmente, se ha establecido la posible relación entre frecuencia de recombinación y la patogenicidad en cepas de *E. coli* uropatógenicas (Rodríguez-Beltrán et al., 2015). La activación de sistema SOS de respuesta a estrés incrementa también la frecuencia de recombinación en la células mediante la expresión del inductor *recA* (Little & Mount, 1982). El proceso de recombinación puede ocurrir entre fragmentos génicos propios, así como también ocurre con DNA exógeno.

1.1.3 Transferencia horizontal. La transferencia horizontal hace referencia a la adquisición, por parte de la célula bacteriana, de DNA exógeno. Este proceso puede ocurrir mediante transformación (Avery, Macleod, & McCarty, 1944), transducción (Luria & Human, 1952) o conjugación (Tatum & Lederberg, 1947). La transferencia horizontal, también denominada flujo horizontal, permite la adquisición de fragmentos génicos, de genes completos, así como también de plásmidos y bacteriófagos. La secuencia génica adquirida no necesariamente proviene de especies bacterianas filogenéticamente relacionadas, sino que este mecanismo permite el intercambio génico entre especies distantes, aumentando con esto la posibilidad de variabilidad genética de la célula receptora (Nelson et al., 1999). Los fragmentos génicos

adquiridos pueden ser incorporados al genoma bacteriano mediante recombinación. La transferencia de material genético del tipo plasmídico permite la adquisición de nuevas características fenotípicas y genotípicas sin la necesidad de modificar el genoma bacteriano, pudiendo, a su vez, ser transferidos a otras especies. Tanto la adquisición de genes provenientes de especies filogenéticamente distantes y su recombinación en el genoma bacteriano, como la adquisición de plásmidos, permiten la obtención de nuevas características genotípicas y fenotípicas, haciendo de este mecanismo uno de los principales promotores de la variabilidad genética y evolución.

La variabilidad genética es indispensable para la evolución, sin embargo, se ha determinado que la mayoría de las modificaciones introducidas en el genoma bacteriano mediante mutación o recombinación tienen un carácter neutro o deletéreo. A pesar de lo anterior, los fenotipos bacterianos con una mayor frecuencia de mutación o recombinación presentan una mayor probabilidad de generar cambios en su genoma que les permitan adaptarse a nuevas condiciones ambientales. De esta manera, aquellos microorganismos que hayan sido capaces de desarrollar variaciones genotípicas y fenotípicas favorables en un ambiente determinado serán seleccionados positivamente en el mismo. El efecto beneficioso del incremento en la variabilidad genética radica en la capacidad de adaptación de las especies, sin embargo, esta ventaja disminuye una vez alcanzada la adaptación (Giraud et al., 2001). Las modificaciones génicas generadas durante este período significan una ventaja en un ambiente determinado, pero éstas pueden generar efectos negativos para su adaptación a nuevos ambientes (Cooper & Lenski, 2000; Giraud et al., 2001).

Si bien estos procesos adaptativos y evolutivos han sido de gran relevancia para la colonización bacteriana de diversos nichos ecológicos, así como también para la constante adaptación a los cambios medioambientales relacionados con la disponibilidad de nutrientes y las condiciones físicas y químicas de sus hábitats, los procesos que sustentan la variabilidad genética en estos microorganismos han sido de especial importancia en el proceso de desarrollo, selección y diseminación de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

1.2 Antibióticos y desarrollo de resistencia

Por definición, los antibióticos son moléculas orgánicas capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos, sin embargo, este término se emplea específicamente para aquellos agentes capaces de ejercer su efecto sobre bacterias. El primer antibacteriano descubierto fue la arsfenamina, conocido también por su nombre comercial Salvarsan. El Salvarsan fue descubierto por el médico alemán Paul Ehrlich, y fue comercializado por primera vez el año 1910. A este compuesto a base de arsénico se le denominó *bala mágica* debido a su toxicidad selectiva sobre células procariotas, específicamente sobre *Treponema pallidum*, agente etiológico de la sífilis (Schwartz, 2004; Thorburn, 1983). En 1935, Gerhard Domagk sintetizó el primer agente antibacteriano sintético, denominado Prontosil, cuya

estructura se basaba en una sulfonamida. Éste presentaba efectividad contra patógenos del género *Staphylococcus*, y su incorporación para el tratamiento de patologías infecciosas tuvo gran impacto, no solo sobre la salud pública, sino también sobre la política internacional. Un ejemplo de ello es que, tras el ataque japonés al puerto de Pearl Harbor, la medicación con sulfonamidas permitió salvar un sinnúmero de vidas.

La utilización de sulfonamidas generó un cambio en la salud pública de la época, pero no fue hasta el descubrimiento y comercialización de la penicilina que los antibióticos fueron introducidos masivamente en la práctica clínica. La penicilina es un antibiótico beta-lactámico producido por el hongo *Penicillium notatum*, descubierto el año 1928 por el médico escocés Alexander Fleming (Fleming, 1929). A pesar de su descubrimiento a comienzos de siglo XX, su producción a gran escala y su introducción a la práctica clínica no se produjo hasta la década de 1940 (Sykes, 2001), influenciada por la necesidad de medicamentos antimicrobianos durante la II Guerra Mundial (IIGM). La utilización de penicilina en los hospitales de campaña contribuyó a la reducción de la mortalidad desde un 25 % observado durante la I Guerra Mundial, a un 3 % durante la IIGM (Neushul, 1993). Tras el descubrimiento de la penicilina, se produjo un incremento en la búsqueda de nuevos antibióticos, dando origen a las diferentes familias que se conocen hoy en día (Abraham, Newton, Crawford, Burton, & Hale, 1953; Johnson, Anker, & Meleney, 1945; McCormick, McGuire, Pittenger, Pittenger, & Stark, 1955; McGuire et al., 1952). A pesar del incremento de moléculas con capacidad antibacteriana descubiertas durante las décadas de 1940 y 1950, el desarrollo y selección de resistencia a las terapias existentes hizo necesaria la búsqueda de nuevos compuestos y estrategias para combatir este tipo de patologías. Es así como en la década de 1960 se da origen a los antibióticos semi-sintéticos, los cuales consisten en modificaciones químicas a los antibióticos previamente descubiertos, dando origen a compuestos con mayor eficacia clínica (Acred, Brown, Knudsen, Rolinson, & Sutherland, 1967; Bajocchi & Massa, 1960; Kariyone, Harada, Kurita, & Takano, 1970; Maggi, Pasqualucci, Ballotta, & Sensi, 1966). En 1962 se sintetizó el ácido nalidíxico, un antibacteriano sintético derivado de naftiridina, que dio origen a una nueva familia de antibacterianos, las quinolonas (Deitz, Bailey, & Froelich, 1963).

En la actualidad se conocen quince familias principales de antibióticos. Esta clasificación se basa en su estructura química y agrupa a los agentes antibacterianos en: aminoglicósidos, beta-lactámicos, cefalosporinas, fenicoles, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, lincosamidas, glicopéptidos, lipopépticos, péptidos catiónicos, ansamicinas, epóxidos, estreptogramidas, oxazolidinonas y pirimidinas.

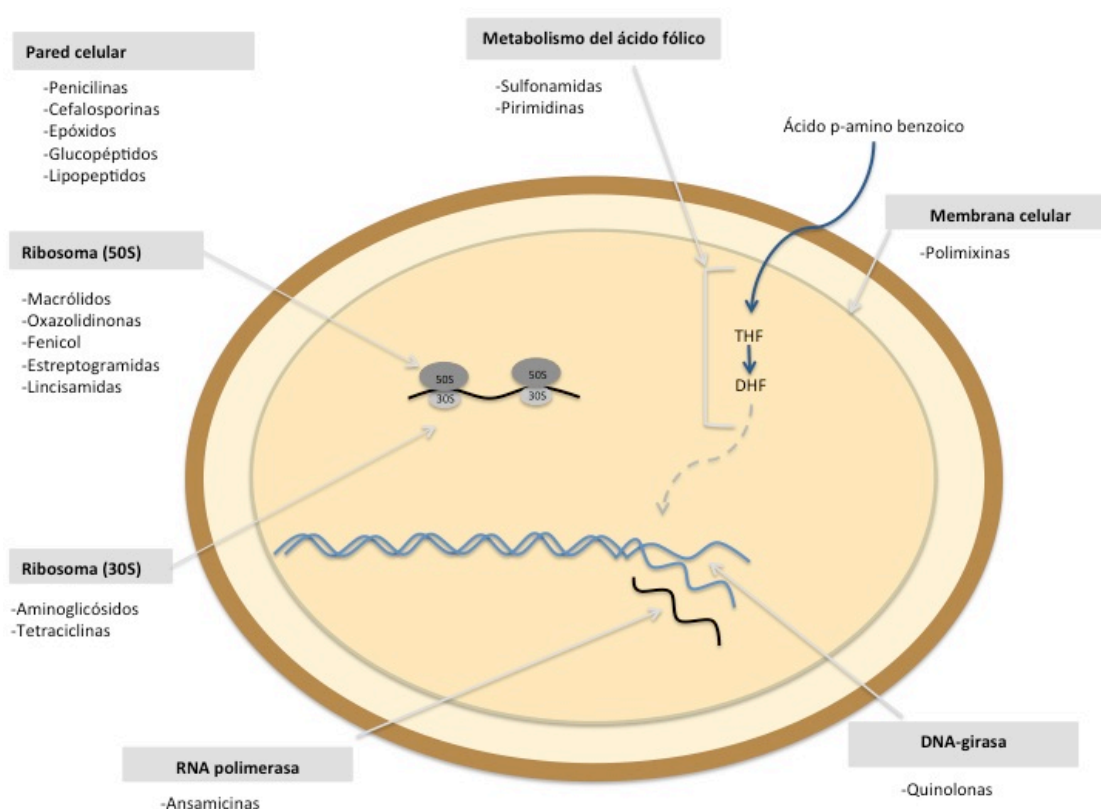


Figura 1. Sitios diana de las principales familias de antibióticos. Esquema de los diferentes sitios dianas de las distintas familias de antibióticos identificadas en la actualidad. La presente figura es una adaptación de lo establecido previamente en la literatura (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

A pesar de la importancia del descubrimiento de los antibióticos, el pronto desarrollo y diseminación de determinantes bacterianos de resistencia a estos compuestos ha hecho de esto uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), sólo en Europa se producen veinticinco mil muertes al año a causa de patógenos resistentes a múltiples antibióticos, generando un incremento en el gasto en prestaciones de salud de 0,9 billones de euros (ECDC & EMA, 2009). Esta situación es un reflejo de lo que ocurre a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados y en vías de desarrollo. Aunque el problema de la resistencia a los antibióticos haya adquirido mayor relevancia en las últimas décadas, ya en la década de 1940 se identificaron cepas bacterianas resistentes a penicilina y estreptomina (Demerec, 1945, 1948, 1949; Schmidt & Sesler, 1943).

Los mecanismos bacterianos de desarrollo y adquisición de resistencia, al igual que cualquier proceso evolutivo, se basa en la variabilidad genética de estos microorganismos, por lo que procesos como la mutación, recombinación y la transferencia horizontal de elementos genéticos son fundamentales. Entre los mecanismos de resistencias identificados en la actualidad se encuentra la modificación de la diana del antibiótico, la degradación enzimática

del mismo, la reducción del ingreso del compuesto a la célula bacteriana y la expulsión del compuesto mediante bombas de expulsión (Alanis, 2005).

La mutación como mecanismo de generación de resistencia a antimicrobianos ha sido ampliamente estudiada. Aun cuando se ha establecido que la mayoría de las mutaciones son neutras o perjudiciales para la célula, la presencia de antibiótico en el medio ejerce una presión de selección sobre el microorganismo. De esta manera, aquellos microorganismos con una mayor capacidad de generar diversidad genética poseen una ventaja en presencia de estos compuestos tóxicos para la célula bacteriana. En este contexto, los microorganismos hipermutadores son de gran relevancia en el desarrollo de resistencia. En la actualidad, se han identificado fenotipos hipermutadores en diversas especies bacterianas naturales, incluyendo cepas patógenas del hombre, entre las cuales se encuentran cepas de *E. coli* uropatógenas (Denamur et al., 2002), *Neisseria meningitidis* (Richardson, Yu, Popovic, & Stojiljkovic, 2002) y *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver, Canton, Campo, Baquero, & Blazquez, 2000).

El desarrollo de resistencia a antimicrobianos mediado por mutaciones puede presentarse de manera individual o de manera cooperativa. En el primer caso, una única mutación en un gen determinado confiere resistencia a un antibiótico particular. Esto es de especial relevancia para antibióticos como la rifampicina y fosfomicina, para los cuales una única mutación en los genes *rpoB* (Jin & Gross, 1988) y *glpT* o *uhpT* (Horii, Kimura, Sato, Shibayama, & Ohta, 1999), respectivamente, genera resistencia a altas concentraciones de dichos antibióticos. Otro ejemplo, donde una única mutación en la estructura diana del antibiótico genera resistencia, son las mutaciones en los genes que codifican la DNA-girasa *gyrA* y *gyrB* que confieren resistencia a algunas quinolonas (S. Nakamura, Nakamura, Kojima, & Yoshida, 1989). Para algunos antibióticos, mutaciones únicas en sus sitios dianas pueden generar resistencia a dichos compuestos, sin embargo, en otros casos se requieren dos o más mutaciones en distintos genes para conferir resistencia. Este es el caso de *Staphylococcus aureus*, para el cual se requieren mutaciones tanto en *gyrA* como en *griA* para conferir resistencia a fluoroquinolonas (Sreedharan, Oram, Jensen, Peterson, & Fisher, 1990).

La ventaja de los fenotipos hipermutadores para el desarrollo de resistencia a antibióticos se ha demostrado que incrementa cuando la resistencia al antimicrobiano requiere dos o más mutaciones (Tenaillon, Toupance, Le Nagard, Taddei, & Godelle, 1999). Los antibióticos no solo actúan como presión de selección de las modificaciones génicas que producen, de manera azarosa, resistencia, sino que también pueden actuar como inductores de la variabilidad genética (Blazquez, 2003). Un ejemplo de esto lo constituyen los antibióticos del tipo quinolonas, los cuales a dosis subinhibitorias provocan un incremento en el estrés oxidativo de la célula, así como también la activación del sistema SOS (Newmark, O'Reilly, Pohlhaus, & Kreuzer, 2005; Thi et al., 2011), el cual, mediante la inducción de la expresión de DNA-polimerasas de baja fidelidad, incrementa la mutagénesis bacteriana. Este incremento permite un aumento en la variabilidad genética, aumentando también la probabilidad de sufrir mutaciones que le confieran resistencia a este u otros antibióticos (Kohanski, DePristo, & Collins, 2010).

La recombinación es también uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo y diseminación de resistencia, ya que permite no sólo el reordenamiento génico, sino también la adquisición de determinantes de resistencias provenientes de otros microorganismos. Uno de los géneros bacterianos que presenta naturalmente una mayor frecuencia de recombinación es *Streptococcus*, género al cual pertenece el microorganismo patógeno *Streptococcus pneumoniae*. La resistencia a penicilina de esta especie se generó mediante eventos de recombinación en el gen *pbpX* que codifica la proteína PBP 2x, una proteína de unión a penicilina. El proceso de recombinación genera una modificación de la proteína, perdiendo así su sensibilidad a este antibiótico (Laible, Spratt, & Hakenbeck, 1991). En el caso de la recombinación, los antibióticos, al igual de lo que ocurre con la mutación, ejercen su efecto como presión de selección, así como también como inductores de este proceso. En la actualidad se ha identificado que concentraciones subinhibitorias de quinolonas pueden inducir la recombinación en *E. coli* tanto de secuencias homólogas como de secuencias divergentes (Lopez & Blazquez, 2009; Lopez, Elez, Matic, & Blazquez, 2007).

La transferencia horizontal de genes, además de permitir la adquisición de fragmentos génicos que pueden integrarse a la célula bacteriana mediante recombinación, permite la adquisición de otros elementos genéticos como transposones, integrones y plásmidos. Los transposones e integrones son elementos genéticos móviles capaces de integrarse en el DNA de la célula receptora. En su mayoría, estos elementos se encuentran insertos en plásmidos, sin embargo, también es posible encontrarlos como elementos génicos independientes. Actualmente, se ha establecido la relación entre integrones y resistencia a diversos antibióticos en enterobacterias (White, McIver, & Rawlinson, 2001), contribuyendo a la diseminación de resistencia. Elementos del tipo transposones con determinantes de resistencia se han identificado en distintas cepas bacterianas como *S. pneumoniae* y *S. aureus* (Ito, Okuma, Ma, Yuzawa, & Hiramatsu, 2003).

La transferencia horizontal de plásmidos es uno de los mecanismo de adquisición y diseminación de resistencia más relevantes. Estos plásmidos codifican enzimas que permiten la modificación química del antibiótico, así como también enzimas que permiten la modificación de la diana del mismo. Este tipo de mecanismo de resistencia se ha observado en microorganismos como *Acinetobacter* (F. W. Goldstein et al., 1983), *E. coli* (Wang et al., 2003), *Klebsiella* (Casewell & Phillips, 1981), *Salmonella* (F. W. Goldstein et al., 1986; Winokur et al., 2000), *Yersinia pestis* (Galimand et al., 1997) y *Streptococcus* (Courvalin, Carlier, & Collatz, 1980), otorgando resistencia a diversos antimicrobianos.

Hoy en día, se han dilucidado los mecanismos de resistencia bacterianos para los diferentes antibióticos disponibles en la práctica clínica, lo que ha permitido la implementación de nuevas estrategias para el tratamiento farmacológico de infecciones bacterianas. Un ejemplo de esto es la identificación del mecanismo de resistencia a antibióticos beta-lactámicos mediado por enzimas del tipo beta-lactamasas, lo que permitió establecer que la administración concomitante de este tipo de antibióticos con un agente inhibidor de la actividad de este tipo de enzimas permite incrementar el espectro de acción de estos

compuestos. A pesar de la gran importancia de lo anterior y lo fundamental que ha sido el aislamiento de cepas resistentes para conocer los diferentes mecanismos de resistencia, es necesario también determinar los factores que contribuyen a la generación de resistencia, así como las trayectorias evolutivas que dan origen a estos fenotipos.

La evolución bacteriana hacia la resistencia es un proceso complejo en el cual intervienen múltiples variables. Este proceso se ha relacionado, principalmente, con la exposición bacteriana a antibióticos, incluso a dosis subinhibitorias (Andersson & Hughes, 2012), aunque también se ha descrito la generación de cepas resistentes a antibióticos en ausencia de este tipo de compuestos (Rodríguez-Verdugo, Gaut, & Tenaillon, 2013). El tipo de antibiótico es otro de los factores que influyen en el proceso evolutivo. Para antibióticos como la rifampicina, fosfomicina y compuestos del tipo quinolonas, una única mutación es capaz de producir un fenotipo bacteriano resistente a altas concentraciones de antibiótico (Leavis, Willems, Top, & Bonten, 2006; Y. J. Lee et al., 2010; Takahata et al., 2010), mientras que en otros casos se requieren mutaciones sucesivas para alcanzar niveles de resistencia clínicamente relevantes. Estudios *in vitro* han permitido establecer que es posible que una cepa bacteriana sensible adquiera resistencia mediante mutaciones sucesivas y que éstas sean seleccionadas en función del tiempo y la concentración de antibiótico (Friedman, Alder, & Silverman, 2006; Y. J. Lee et al., 2010; Toprak et al., 2012). La evolución bacteriana no es únicamente relevante en la generación *de novo* de resistencia, sino también en la modificación del espectro de acción de enzimas con la capacidad de inactivar antibióticos (Blazquez, Morosini, Negri, Gonzalez-Leiza, & Baquero, 1995). Aun cuando la evolución hacia la resistencia de un antibiótico particular confiere una ventaja competitiva en presencia de dicho compuesto, se ha establecido que el proceso evolutivo puede generar también un incremento en la sensibilidad a otros compuestos antibacterianos (Lazar et al., 2013). La variabilidad genética desarrollada mediante el proceso evolutivo confiere a la población bacteriana una diversidad que puede contribuir a la resistencia de la población como tal, sin embargo, de manera individual, no todas las células que conforman la población presentan el mismo fenotipo de resistencia. Este efecto *colaborativo* permite que cepas bacterianas con mayor sensibilidad resistan mayores concentraciones de antibiótico gracias al efecto protector que ejerce el metabolismo de las cepas resistentes presentes en la población sobre ellas (Lee, Molla, Cantor, & Collins, 2010).

1.2.1. Aminoglicósidos: Mecanismo de acción y resistencia

Los antibióticos aminoglicósidos fueron los primeros antibióticos descubiertos mediante la búsqueda sistemática de compuestos con propiedades antibacterianas y el primer representante de este grupo fue la estreptomicina, descubierta el año 1944 (Schatz, Bugle, & Waksman, 1944). La estructura base de estos antibióticos consiste en una molécula de 2-desoxi-estreptamina con un sustituyente de amino-azúcares en posición 4-,5- o 4-,6-.

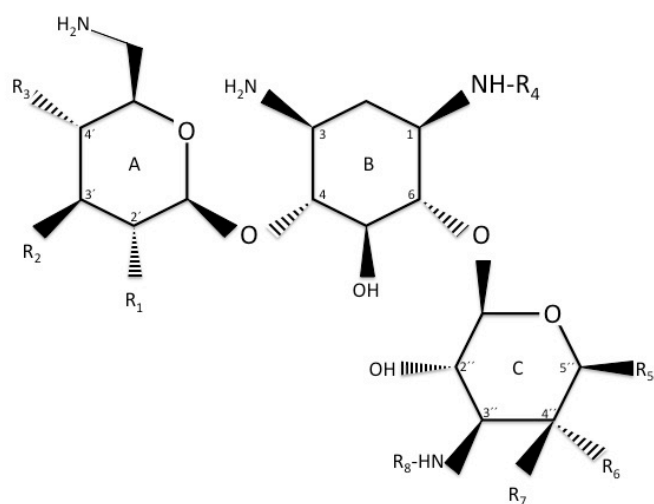


Figura 2 Estructura base de los antibióticos aminoglicósidos con sustituciones 4,6-.

Basándose en la posición de las sustituciones aminoglucosídicas, estos antibióticos se clasifican en dos grupos; sustituciones en posición 4,5-, y sustituciones en posición 4,6-. Correspondiente al primer grupo, hoy en día el único representante aun comercializado es la Neomicina B, mientras que el segundo grupo estructural es el de mayor relevancia para la clínica. Entre los representantes de éste se encuentran la gentamicina, la amikacina y la tobramicina.

En términos generales, los antibióticos del tipo aminoglicósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma, específicamente al sitio A o región descodificadora. Esta unión provoca un cambio conformacional en el ribosoma que da como resultado una interacción mRNA-tRNA errónea (Noller, 1991), generando péptidos truncados, lo cual produce la interrupción de la traducción. Se ha estipulado también que esta unión afecta la translocación de tRNA desde el sitio A al sitio P (Moazed & Noller, 1987).

El ingreso de este tipo de antibióticos a la célula bacteriana se ha determinado como un proceso de tres etapas (Bryan & Van den Elzen, 1976). La primera de ellas es independiente de energía y se basa en la afinidad de estos antibióticos de tipo catiónico con la superficie bacteriana de carga negativa. Una vez producida esta aproximación debido a sus cargas, se han descrito dos mecanismos principales de ingreso; i) ingreso a través de canales del tipo porinas, y ii) disrupción de la membrana externa debido al desplazamiento de iones de magnesio necesarios para la estabilidad de la misma, permitiendo su ingreso a través de ella (Andry & Bockrath, 1974; Bryan & Van den Elzen, 1976; Kadurugamuwa, Clarke, & Beveridge, 1993; Nakae & Nakae, 1982).

La segunda etapa de ingreso de aminoglicósidos, también denominada EDPI, por su nombre en inglés *energy-dependent phase I*, consiste en una fase dependiente de energía que requiere

de la fuerza protón motriz y la generación del potencial de membrana para producir el ingreso del antibiótico (Damper & Epstein, 1981). En esta etapa interviene la cadena transportadora de electrones, y la inactivación de este proceso disminuye la entrada de este tipo de antibióticos a la célula (Bryan & Kwan, 1983; Miller, Edberg, Mandel, Behar, & Steigbigel, 1980). Si bien se ha establecido que la respiración celular es determinante para el ingreso de aminoglicósidos, Wallace y colaboradores establecieron que esto se debe, principalmente, a una disminución de la velocidad de crecimiento, donde la velocidad de crecimiento previo a la adición del antibiótico determina la velocidad de esta etapa: a mayor velocidad de crecimiento, mayor velocidad de ingreso del antibiótico a la célula (Muir, Ballesteros, & Wallace, 1985).

La tercera etapa de entrada de aminoglicósidos a la célula, EPDII, es un proceso dependiente de energía y requiere de ribosomas funcionales. Debido al ingreso del antibiótico a la célula durante la fase EPDI, la célula bacteriana produce péptidos modificados y/o truncados que se incorporan a la membrana plasmática, generando una desestabilización de la misma, permitiendo la entrada del antibiótico a mayor velocidad (Davis, Chen, & Tai, 1986). Es durante esta etapa que se produce la mayor entrada y efecto de los aminoglicósidos a la célula bacteriana. Cabe destacar que esta última fase sólo ocurre si los ribosomas bacterianos son funcionales, y mutaciones en las proteínas ribosomales que confieren resistencia a estreptomicina, al igual que el uso en concomitancia de otros antibióticos que inhiben la síntesis proteica, han demostrado que, de no ser así, esta etapa no se lleva a cabo (Ahmad, Rechenmacher, & Bock, 1980; Bryan & Kwan, 1983; Bryan & Van den Elzen, 1976; Muir, van Heeswyck, & Wallace, 1984).

Entre los mecanismos de resistencia identificados para aminoglicósidos se encuentran la modificación enzimática de los compuesto, la disminución de su ingreso y acumulación en la célula bacteriana, la expulsión mediante bombas de expulsión y la modificación de su diana.

La modificación enzimática de aminoglicósidos es el mecanismo de resistencia de mayor relevancia clínica en la actualidad. Las enzimas identificadas pertenecen a tres tipos: aminoglicósido-fosfotransferasas, aminoglicósido-nucleotidiltransferasas y aminoglicósido-acetiltransferasas (Azucena, Graspas, & Mobashery, 1997; Daigle, McKay, Thompson, & Wright, 1999; Fling, Kopf, & Richards, 1985; Nemec & Maixnerova, 2004; Ramirez & Tolmasky, 2010; Wright, 1999; Wright & Thompson, 1999). Las modificaciones enzimáticas producidas alteran la afinidad del antibiótico con el ribosoma, lo que tiene como consecuencia no sólo la disminución de su efecto a nivel de la síntesis proteica, sino que también disminuye o impide la EDPII.

La modificación de la subunidad 30S del ribosoma también se ha identificado como un mecanismo de resistencia a aminoglicósidos, ya sea mediante acción enzimática (Beauclerk & Cundliffe, 1987; Doi & Arakawa, 2007; Galimand, Courvalin, & Lambert, 2003; Yokoyama et al., 2003) o mediante mutaciones de los componentes ribosomales (Buckel, Buchberger, Bock, & Wittmann, 1977), sin embargo, este último mecanismo requiere que al menos el 50% de las

copias de los genes que codifican para el rRNA presenten la mutación que confiere resistencia. Debido a que *E. coli* presenta múltiples copias de estos genes, éste no es un mecanismo significativo en esta cepa, pero en microorganismos del género *Mycobacterium* que sólo poseen una copia de estos genes, la mutación del rRNA es un mecanismo de resistencia a aminoglicósidos de importancia clínica (Suzuki et al., 1998).

Debido a que el ingreso de estos fármacos a la célula requiere de transporte activo mediado por la fuerza protón motriz, la alteración de la cadena de transporte de electrones o la ausencia de oxígeno también se han indicado como un mecanismo de resistencia a aminoglicósidos (Bryan, Kowand, & Van Den Elzen, 1979; Miller et al., 1980). Éste es de especial importancia en fenotipos bacterianos formadores de colonias pequeñas, o SCV, del inglés *small colony variants*. Este fenotipo ha sido ampliamente estudiado en *S. aureus* y entre sus principales características destacan un tamaño de colonias aproximadamente diez veces menor que su ancestro, menor velocidad de crecimiento, alteraciones en la cadena transportadora de electrones y presentar auxotrofia para hemina, menadiona, tiamina o timidina (Balwit, van Langevelde, Vann, & Proctor, 1994; Sasarman et al., 1968; Schaaff, Bierbaum, Baumert, Bartmann, & Sahl, 2003). El fenotipo SCV se ha relacionado a la exposición bacteriana a antibióticos del tipo aminoglicósidos y puede ser revertido al fenotipo silvestre en ausencia del antibiótico (Schaaff et al., 2003). El mecanismo por el cual se genera el fenotipo SCV, ya sea regulatorio o mediante mutaciones, no ha sido del todo dilucidado en la actualidad, sin embargo, mutaciones en los genes *hemA*, *hemH*, *menD* y *ctaA* se han relacionado con este fenotipo (Bates et al., 2003; Clements, Watson, Poole, & Foster, 1999; Saurina, Hernandez-Cassou, Tauler, & Izquierdo-Ridorsa, 1999; von Eiff et al., 2006).

Al igual que ocurre con otros tipos de antibióticos, se han identificado bombas capaces de expulsar antibióticos del tipo aminoglicósido de la célula bacteriana. Entre las bombas identificadas se encuentran AcrD en *E. coli*, AdeAB en *A. baumannii*, AmrAB-OprA en *Burkholderia pseudomallei* y MexXY-OprM en *P. aeruginosa* (Aires, Kohler, Nikaido, & Plesiat, 1999; Hocquet et al., 2003; Magnet, Courvalin, & Lambert, 2001; Moore, DeShazer, Reckseidler, Weissman, & Woods, 1999; Rosenberg, Ma, & Nikaido, 2000).

1.2.2 Gentamicina como modelo de estudio de resistencia a antibióticos aminoglicósidos

La gentamicina es un aminoglicósido producido por *Micromonospora purpurea* y descubierto en 1963 (Weinstein, Luedemann, Oden, & Wagman, 1963; Weinstein, Luedemann, Oden, Wagman, et al., 1963). Este fármaco es utilizado, actualmente, para el tratamiento de patologías infecciosas producidas por microorganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella* (Avent, Rogers, Cheng, & Paterson, 2011).

Al igual que otros aminoglicósidos, la gentamicina se une al sitio A del ribosoma, protegiendo las bases A1408 y A1494 (Yoshizawa, Fourmy, & Puglisi, 1998). A diferencia de lo que ocurre con otros compuestos pertenecientes a esta familia, la gentamicina interactúa tanto con la subunidad 30S del ribosoma, a través de su unión a la hélice 44 (h44), como también con la subunidad 50S, a través de la hélice 69 o H69 (Borovinskaya et al., 2007). Es debido a lo anterior que la gentamicina, además de generar un cambio conformacional que altera el sitio A del ribosoma y disminuir la fidelidad de la traducción, tiene la capacidad de inhibir el proceso de *reciclaje* del ribosoma. Este proceso consiste en que, una vez finalizada la traducción de la cadena polipeptídica, las subunidades ribosomales que forman el ribosoma 70S se separan para dar así inicio a un nuevo ciclo de traducción. Este proceso requiere de la acción del factor de reciclaje del ribosoma (RRF) y del factor de elongación G (EF-G) (Ning Gao et al., 2005; Hirokawa, Demeshkina, Iwakura, Kaji, & Kaji, 2006; Kiel, Kaji, & Kaji, 2007; Zavialov, Hauryliuk, & Ehrenberg, 2005). La unión de la gentamicina en H69 de la subunidad 50S se ha relacionado también con la inhibición de la translocación (Kotra, Haddad, & Mobashery, 2000). Además, mutaciones en la proteína ribosomal L6 aumentan diez veces la resistencia a este antibiótico (Buckel et al., 1977), lo que sugiere que esta proteína es importante para su interacción con el ribosoma.

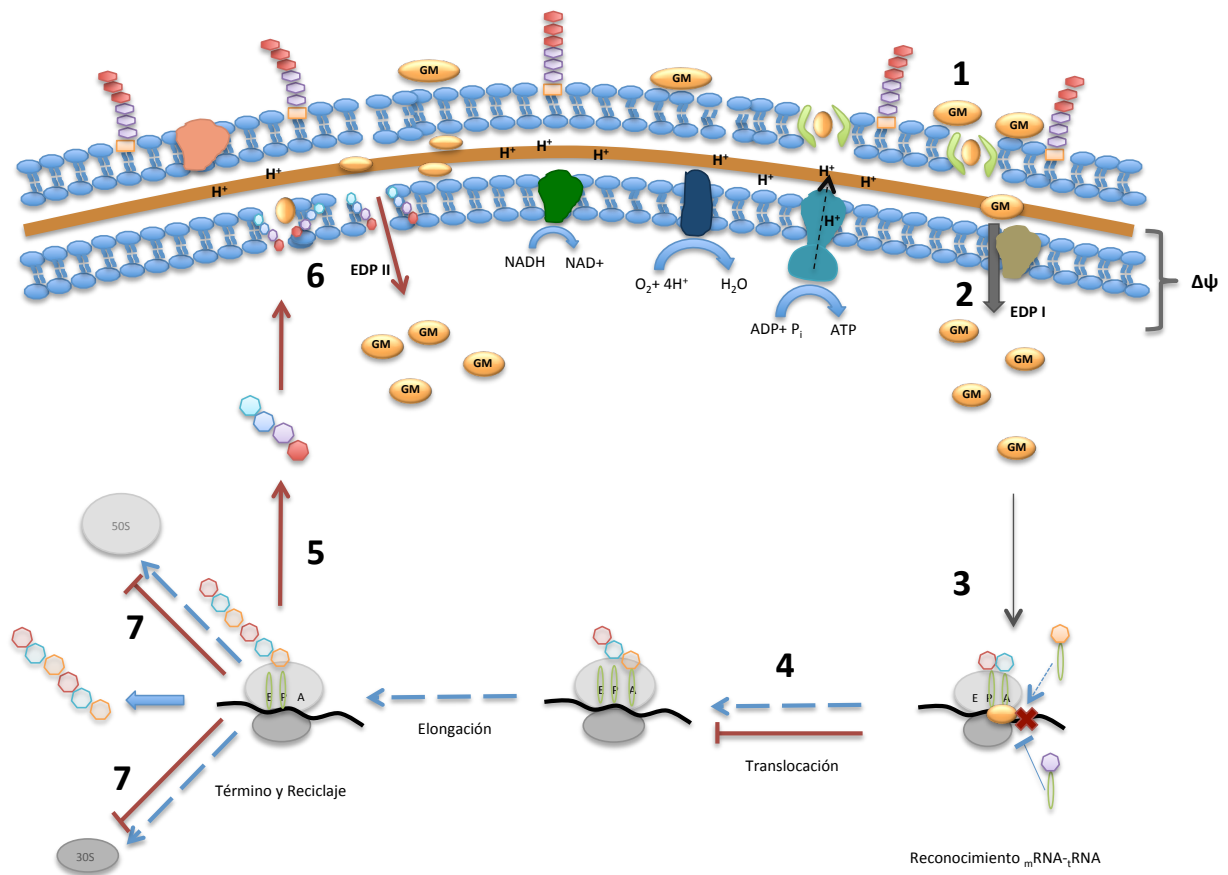


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de la gentamicina en *E. coli*. 1: **Adhesión y difusión.** Debido a la carga negativa de la superficie celular y la carga positiva de la gentamicina, ésta se adhiere a la superficie bacteriana y difunde a través de porinas hacia el interior. 2: **EDPI.** Esta fase de ingreso a la célula requiere del potencial de membrana generado a través de la fuerza protón motriz, sin embargo, el mecanismo exacto de entrada se desconoce. 3: **Unión de la gentamicina al sitio A del ribosoma.** Esta unión genera un cambio conformacional que impide al ribosoma distinguir entre tRNA cognatos y no-cognatos. 4: **Inhibición de la translocación.** La unión del ribosoma al sitio A inhibe la translocación del sitio A al sitio P del ribosoma. 5: **Desestabilización de la membrana.** Debido a la pérdida de la fidelidad durante la transcripción y a la inhibición de la translocación, se generan péptidos truncados que se incorporan a la membrana y la desestabilizan, generando poros. 6: **EDPII.** La generación de poros en la membrana da origen a la segunda fase de entrada del antibiótico dependiente de energía. Durante esta fase aumenta la velocidad de ingreso de gentamicina a la célula. 7: **Inhibición del proceso de reciclaje del ribosoma.** La gentamicina inhibe la separación de ribosoma 70S en sus subunidades para dar origen a un nuevo ciclo de traducción. Las figuras no están representadas a escala real.

En *P. aeruginosa* se ha observado que la gentamicina desestabiliza la membrana externa, estimulando la formación de vesículas de membrana y, con esto, la liberación de factores de virulencia (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995, 1997), mientras que en *S. aureus* este antibiótico induce la formación de biofilm (Hess, Henry-Stanley, & Wells, 2011). En relación a *S. aureus*, se ha establecido también una relación entre la exposición bacteriana a gentamicina y la generación SCV, siendo esto de especial relevancia clínica debido a su resistencia a aminoglicósidos (Schaaff et al., 2003).

Actualmente, el mecanismo de resistencia a gentamicina con mayor relevancia clínica es la inactivación enzimática del compuesto. Entre las enzimas modificadoras de gentamicina se encuentran las del tipo aminoglicósido acetiltransferasas pertenecientes a los subtipos ACC(3), ACC(2') y ACC(6'). También se han identificados enzimas del tipo aminoglicósido O-nucleotidiltransferasas y aminoglicósido O-fosfotransferasas, pertenecientes a los subtipos ANT(2'') y APH(2''), respectivamente (Ramírez & Tolmasky, 2010).

Diferentes estudios han tratado de definir el conjunto de variaciones genéticas responsables de la resistencia a gentamicina o *resistoma*. Para definir este *resistoma* se han empleado diferentes métodos mutacionales como la inactivación de genes por transposición y delección, o la sobreexpresión mediante plásmidos de alto número de copias (Aaron et al., 1980; Kashiwagi et al., 1998; T. X. Liu, Xue, Wei, & Zhang, 2009; Moore et al., 1999; von Eiff et al., 2006; Young, Bains, Bell, & Hancock, 1992). Sin embargo, estos estudios, debido a su naturaleza, detectan sólo las variantes con pérdida de actividad o expresión afectada. Nuestro estudio, por tanto, pretende evaluar los posibles mecanismos de resistencia a gentamicina, incluyendo aquellas mutaciones que afecten la actividad intrínseca de los productos génicos, no detectados por los métodos anteriores.

1.3 *Escherichia coli* Δ *dnaQ* como modelo de estudio para el desarrollo de resistencia a gentamicina

El gen *dnaQ* de *E. coli* codifica para la subunidad ϵ de la enzima DNA-polimerasa III, y su función es la detección y corrección de errores introducidos durante la replicación, para maximizar la fidelidad de la misma (Echols, Lu, & Burgers, 1983; Scheuermann et al., 1983). La delección de este gen genera un fenotipo bacteriano hipermutador, cuya tasa de mutación puede incrementar entre tres y cuatro órdenes de magnitud respecto al fenotipo silvestre (Echols et al., 1983). Estas características genotípicas y fenotípicas permiten la utilización de esta cepa bacteriana para la evaluación de la aparición de mutaciones espontáneas que generen resistencia a antibióticos.

El presente estudio evaluó la capacidad adaptativa de *E. coli* MG1655 y de su derivado de delección Δ *dnaQ* en presencia de dosis crecientes del antibiótico gentamicina. Debido a que el fenotipo hipermutador de la cepa Δ *dnaQ* se relaciona a la replicación del material genético, este estudio se llevó a cabo en cultivos continuos del tipo quimiostato, los cuales permiten mantener las condiciones de crecimiento constante en fase exponencial. Esto es de especial importancia para antibióticos del tipo aminoglicósido, ya que su ingreso a la célula depende de la velocidad de crecimiento. De esta manera, se mantienen las condiciones óptimas para que el antibiótico gentamicina ejerza su efecto sobre la célula bacteriana. La utilización del quimiostato como modelo de estudio permite mantener constantes las condiciones físicas, químicas y nutricionales del medio (Monod, 1949), donde la principal variante es la concentración del antibiótico gentamicina. La utilización de cultivos continuos permite

también seleccionar en relación a la velocidad de crecimiento de los microorganismos adaptados al antibiótico, debido que, al tratarse de un cultivo continuo, aquellos microorganismos cuya pérdida de *fitness* disminuya su velocidad de duplicación hasta ser menor que la dilución del cultivo, serán lavados del mismo, excluyéndose del estudio (Dykhuizen & Hartl, 1983).

Objetivos

2 Objetivos

Estudiar la evolución bacteriana hacia la resistencia a gentamicina de *Escherichia coli*, utilizando como modelo de estudio la cepa normomutadora MG1655 y su derivada deficiente en el sistema de corrección de errores de la DNA-polimerasa III con fenotipo hipermutador $\Delta dnaQ$.

Aislar y caracterizar, fenotípica y genotípicamente, cepas resistentes a gentamicina derivadas a partir de los ensayos de evolución de MG1655 y $\Delta dnaQ$.

Analizar las diferencias y similitudes entre las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655 y $\Delta dnaQ$.

Determinar las mutaciones presentes en las cepas resistentes a gentamicina y establecer su contribución al fenotipo bacteriano de resistencia.

Determinar las trayectorias evolutivas de las mutaciones observadas en las cepas resistentes a gentamicina.

Metodología

3 Metodología

3.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Cepa	Descripción	Fuente o Referencia
MG1655	F- λ - <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	Colección del Laboratorio
BW25113	F- Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787::rrnB-3, LAM- <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsdR</i> 514	Colección del Laboratorio
JW0205	BW25113 Δ <i>dnaQ</i> ::Kan, KanR	Colección Keio (Baba et al., 2006)
JW3711	BW25113 Δ <i>atpG</i> ::Kan, KanR	Colección Keio (Baba et al., 2006)
JW0422	BW25113 Δ <i>cyoA</i> ::Kan, KanR	Colección Keio (Baba et al., 2006)
DH5α	F-, <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR</i> 17($r_K^- m_K^+$), λ -	Colección de Laboratorio
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX</i> 74 <i>galE galk phoA</i> 20 <i>thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> λ pir phage lysogen	Laboratorio Dr. L.A. Fernández (de Lorenzo & Timmis, 1994)
JM109	F' <i>traD</i> 36 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15/ Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>glnV44 e14</i> - <i>gyrA</i> 96 <i>recA1 relA1 endA1 thi</i> <i>hsdR</i> 17	Laboratorio Dr. L.A. Fernández
MG1655 Δ<i>dnaQ</i>::Kan	MG1655 Δ <i>dnaQ</i> ::Kan. KanR	Este trabajo
Δ<i>dnaQ</i>	MG1655 Δ <i>dnaQ</i>	Este trabajo
CIQ1E	Cepa dreivada de Δ <i>dnaQ</i> resistente a gentamicina	Este trabajo
CIQ1G	Cepa dreivada de Δ <i>dnaQ</i> resistente a gentamicina	Este trabajo
CIQ2J	Cepa dreivada de Δ <i>dnaQ</i> resistente a gentamicina	Este trabajo
CIQ4J	Cepa dreivada de Δ <i>dnaQ</i> resistente a gentamicina	Este trabajo
CIM5H	Cepa dreivada de MG1655 resistente a gentamicina	Este trabajo
CIM5N	Cepa dreivada de MG1655 resistente a gentamicina	Este trabajo
CIM8C	Cepa dreivada de MG1655 resistente a gentamicina	Este trabajo
CIM8M	Cepa dreivada de MG1655 resistente a gentamicina	Este trabajo
FhuA197	Cepa derivada de MG1655 con un cambio en el marco de lectura de FhuA a partir del residuo 197	Este trabajo
EFG593	Cepa derivada de MG1655 con una sustitución F593L en el Factor de Elongación G (EF-G).	Este trabajo
PotA208	Cepa derivada de MG1655 con una sustitución Q208L en PotA.	Este trabajo

Tabla 1. Principales cepas de *Escherichia coli* utilizadas durante este estudio.

Plásmido	Descripción	Fuente o referencia
pCA24N	ColE1-ori <i>cat lacIq</i> PT5lac, Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pCA-<i>atpG</i>	Plásmido derivado de pCA24N con inserción de <i>atpG</i> . Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pCA-<i>cyoA</i>	Plásmido derivado de pCA24N con inserción de <i>cyoA</i> . Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pCA-<i>fhuA</i>	Plásmido derivado de pCA24N con inserción de <i>fhuA</i> . Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pCA-<i>fusA</i>	Plásmido derivado de pCA24N con inserción de <i>fusA</i> . Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pCA-<i>potA</i>	Plásmido derivado de pCA24N con inserción de <i>potA</i> . Cm ^r R.	Colección ASKA (Kitagawa et al., 2005)
pKD46	<i>repA101(ts)</i> oriR101 <i>bla</i> ParaB-(gam bet exo). Amp ^r	(Datsenko & Wanner, 2000).
pCP20	λ cl857(ts) <i>repA101(ts)</i> oriR101 <i>bla cat</i> λ pR-FLP. Cm ^r R, Amp ^r .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pGE	R6K-ori, región <i>polylinker</i> delimitada por dos sitios de restricción I-SceI. Cm ^r R.	(Piñero-Lambeck et al., 2015)
pGE<i>atpG</i>	Plásmido derivado de pGE con inserción de gen <i>atpG</i> (cambio en el marco de lectura a partir de residuo 245) en sitio <i>polylinker</i>	Este trabajo
pGE<i>cyoA</i>	Plásmido derivado de pGE con inserción de gen <i>cyoA</i> , con ganancia de codón de término en residuo 67, en sitio <i>polylinker</i> . Kan ^r .	Este trabajo
pGE<i>fhuA</i>	Plásmido derivado de pGE con inserción de gen <i>fhuA</i> , con cambio en el marco de lectura a partir de residuo 197, en sitio <i>polylinker</i> . Kan ^r .	Este trabajo
pGE<i>fusA</i>	Plásmido derivado de pGE con inserción de gen <i>fusA</i> , con sustitución F593L, en sitio <i>polylinker</i> . Kan ^r .	Este trabajo
pGE<i>potA</i>	Plásmido derivado de pGE con inserción de gen <i>potA</i> , con sustitución Q208L, en sitio <i>polylinker</i> . Kan ^r .	Este trabajo
pACBSR	p15A-ori, PBAD, I-SceI, λ Red. Cm ^r R.	(Herring, Glasner, & Blattner, 2003)
pSC101-<i>PrecA</i>::GFP	Fusión transcripcional de GFP a <i>PrecA</i> . Kan ^r .	(Ronen, Rosenberg, Shraiman, & Alon, 2002).

Tabla 2. Plásmidos utilizados durante este estudio.

Gen	Oligo	Secuencia (5' - 3')	Referencia
<i>dnaQ</i>	dnaQ-F	TAATTGAATCGAACTGTAAAAC	(Baba et al., 2006)
	dnaQ-R	GCTATTTTATAGCGCTTTCACA	
<i>atpG</i>	atpG-F-XhoI	ACACACCTCGAGTTCAAAGCAACCCAATCCTG	Este trabajo
	atpG-R-SpeI	ACACACACTAGTGACAATCTTTCCAGTAGCCATC	
<i>cyoA</i>	cyoA-F	CCGAACATCTTTATTCTTCTCAAC	(Baba et al., 2006)
	cyoA-R	CACACACTTTAAACGCCACCAGA	
	cyoA-F-XhoI	ACACACCTCGAGATGAGACTCAGGAAATACAATAA	Este trabajo
	cyoA-R-SpeI	ACACACACTAGTTCACCTTCTGGCTGGGTCA	
<i>fhuA</i>	fhuA-F-XhoI	ACACACCTCGAGATGGCGGTTCCAAAACCTGCTCAG	Este trabajo
	fhuA-R-SpeI	ACACACACTAGTGCGGTTGCAACGACCTGACGTT	
<i>fusA</i>	fusA-F-XhoI	ACACACCTCGAGATGGCTCGTACAACCCATCGC	Este trabajo
	fusA-R-SpeI	ACACACACTAGTTTATTTACCACGGGCTTCAATTAC	
<i>potA</i>	potA-F-XhoI	ACACACCTCGAGATGGGACAGAGTAAAAAATTGAATAAAC	Este trabajo
	potA-R-SpeI	ACACACACTAGTTCAGCCAGTACGACCTCCCA	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados durante este estudio.

3.2 Ensayo de evolución y selección de cepas resistentes

Para el ensayo de evolución se utilizaron las cepas *Escherichia coli* MG1655 y su derivada Δ *dnaQ*. La cepa mutante de delección del gen *dnaQ* se construyó mediante recombinación homóloga según lo establecido por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000), utilizando como molde la cepa JW0205 proveniente de la colección KEIO (Baba et al., 2006). Tanto la cepa MG1655 como Δ *dnaQ* fueron adaptadas a medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0,2 % (p/v) como única fuente de energía y carbono durante siete días, equivalentes a 56 generaciones, aproximadamente.

Las cepas MG1655 y Δ *dnaQ* fueron utilizadas, de manera independiente, como ancestros para los ensayos de evolución. Éstos se realizaron en cultivos continuos del tipo quimiostato, en los cuales en lugar de utilizar un componente nutricional limitante se utilizó el antibiótico gentamicina como limitante del crecimiento. Para cada caso, cultivos *overnight* de cada cepa fueron inoculados en quimiostatos conteniendo 40 ml de medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración de 0,03 µg/ml, equivalente a 0,125 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de gentamicina para ambas cepas. Cada cepa fue evaluada en cuadruplicado. Los quimiostatos fueron alimentados continuamente con medio de cultivo suplementado con antibiótico a una dilución de 0,24 h⁻¹, y los cultivos se mantuvieron a 37 °C y una aireación de 1,2 l/h. La concentración de gentamicina en el medio de cultivo se incrementó gradualmente, mediante la duplicación de la misma cada tres días. Los ensayos de evolución se llevaron a cabo hasta alcanzar una concentración de gentamicina de 256 µg/ml, equivalente a 1024 veces la CMI de las cepas ancestrales. Una vez alcanzada

esta dosis, muestras provenientes de cada quimiostato fueron sembradas en placas de agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (256 µg/ml) e incubadas a 37 °C durante 48 horas. A partir de estas placas se aislaron colonias puras y se crecieron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina para su criopreservación y posterior caracterización.

Durante el ensayo de evolución se tomaron muestras a partir de cada réplica en todas las dosis evaluadas para su posterior análisis, así como también para evaluar una posible contaminación.

3.3 Perfil de sensibilidad a antimicrobianos

Los perfiles de sensibilidad a antimicrobianos se realizaron mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria, utilizando el método de dilución en microplaca, en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas. Cada ensayo se realizó en triplicado.

Los antibacterianos utilizados durante este estudio fueron: amikacina (AMK) ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN) tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BEt).

3.4 Perfil hemolítico

La capacidad hemolítica se determinó utilizando placas de agar Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero (Biomérieux, Marcy l'Etoile). A partir de una colonia aislada se inocularon las placas de agar sangre y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Transcurrido el período de incubación, la capacidad hemolítica se determinó mediante la observación de aparición de un halo alrededor del crecimiento bacteriano. El halo translúcido correspondió a beta-hemólisis, mientras que el halo verde corresponde a hemólisis incompleta o alfa-hemólisis.

3.5 Formación de biofilm

La capacidad de formación de biofilm se determinó mediante tinción con cristal violeta (O'Toole & Kolter, 1998), utilizando placas de 96 pocillos de polivinilo con medio mínimo M9 suplementado con glucosa, y medio mínimo suplementado con glucosa y gentamicina a una

concentración de 64 µg/ml. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 48 horas. Previo a la tinción con cristal violeta se evaluó la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 595 nm. Cada ensayo se llevó a cabo en cuádruplicado, y los resultados de la tinción fueron normalizados mediante la Abs_{595nm} . Los resultados se expresaron como ratio de formación de biofilm respecto a la cepa ancestral.

3.6 Frecuencia de mutantes

La determinación de la frecuencia de mutantes se llevó a cabo en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0,2 % (p/v) y rifampicina a una concentración de 50 µg/ml, o ácido nalidíxico a una concentración de 40 µg/ml. Cultivos *overnight* obtenidos a partir de colonias aisladas de cada cepa en medio mínimo M9 suplementado con glucosa fueron diluidos en medio de cultivo estéril hasta alcanzar las concentraciones bacterianas deseadas. Para la determinación de la frecuencia de mutantes en rifampicina, las placas fueron inoculadas con 10^8 células, mientras que para la determinación en ácido nalidíxico el inóculo estuvo constituido por 10^{10} células. Para determinar el número de células viables de cada cepa, placas de agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa en ausencia de antibiótico fueron inoculadas con aproximadamente 10^3 células. Para todos los casos, las placas fueron incubadas a 37 °C, por 48 horas.

Las frecuencias de mutantes se determinaron mediante el cálculo del ratio entre el número de colonias resistentes respecto al recuento total de células en medio sin antibiótico, en triplicado.

3.7 Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno

La sensibilidad a peróxido de hidrógeno se llevó a cabo mediante la evaluación del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de este compuesto. Ésta se determinó en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa, y las cepas fueron inoculadas en top agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa (0,75 % agar) y expuestas a 26 µmoles de peróxido de hidrógeno durante 48 horas, a 37 °C. En este ensayo se evaluó tanto la sensibilidad de células provenientes de cultivos en fase estacionaria como desde fase exponencial ($Abs_{595nm} = 0,3$). Cada cepa y condición se evaluó en triplicado.

3.8 Caracterización metabólica y bioquímica

Para determinar las variaciones metabólicas en las cepas resistentes a gentamicina se evaluó su capacidad de utilizar diferentes sustratos como única fuente de energía y carbono, respecto a su ancestro. Para esto se utilizaron placas Biolog GN2 según las instrucciones del fabricante (Biolog Inc., California). Las placas fueron incubadas durante 72 horas a 37 °C, con observaciones periódicas cada 24 horas. La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante el análisis en el sistema API20E de (Biomérieux, Marcy l'Etoile), según las instrucciones del fabricante. Para cada inóculo, se resuspendió una colonia aislada proveniente de agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa.

3.9 Morfología celular

La evaluación de posibles cambios en la morfología celular en las cepas resistentes a gentamicina se realizó mediante microscopía de contraste de fases en un microscopio Leica DM4000B (Leica, Wetzlar). Las muestras a evaluar fueron obtenidas desde cultivos bacterianos en fase exponencial ($Abs_{595nm} = 0,3$), en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en presencia y ausencia de gentamicina a una concentración de 64 µg/ml, y se fijaron mediante calor.

3.10 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se evaluó mediante la determinación de las curvas de crecimiento, midiendo la Abs_{595nm} en función del tiempo. Las curvas se llevaron a cabo en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, a 37 °C, durante 48 horas. Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de polivinilo en un espectrofotómetro con incubación marca Tecan, modelo Infinite M200 (Tecan, Männedorf). El crecimiento bacteriano se determinó en ausencia y en presencia de gentamicina a diferentes concentraciones. Cada ensayo se realizó en triplicado. El tiempo de duplicación se determinó utilizando el programa informático GrowthRates (Hall, Acar, Nandipati, & Barlow, 2014).

3.11 Técnicas Moleculares

3.11.1 Técnicas generales

La extracción de DNA genómico se realizó mediante la utilización de DNAeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN (QIAGEN, Hilden), según las instrucciones del fabricante.

La extracción de plásmidos se realizó mediante la utilización de QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La purificación de productos de PCR se realizó mediante la utilización del sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La purificación de DNA desde geles de agarosa se realizó mediante la utilización del sistema QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las digestiones se realizaron con enzimas de restricción de New England Biolabs (Reino Unido) en las condiciones recomendadas por su fabricante.

Las ligaciones de fragmentos de DNA se llevaron a cabo utilizando el sistema T4 DNA ligasa (Roche, Basilea)

3.11.2 PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa, o PCR, se llevaron a cabo mediante la utilización del sistema *Expand High Fidelity System*. Los cebadores utilizados durante este trabajo se enlistan en la Tabla 3. La condiciones de temperatura y tiempo para cada reacción variaron de acuerdo a las longitud de los fragmentos de DNA a amplificar y la T_m de los cebadores.

3.11.3 Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó por electroporación según lo establecido por Dower y colaboradores (Dower, Miller, & Ragsdale, 1988), al igual que la preparación de células competentes. Para éstas, 1 ml de cultivo *overnight* de cada cepa en medio mínimo M9 suplementado con glucosa fue inoculado en 100 ml de medio estéril. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una Abs_{595nm} de 0,6.

3.12 Secuenciación de DNA genómico

La secuenciación del DNA genómico de las cepas seleccionadas se llevó a cabo en la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid. Para cada muestra, se secuenció el DNA genómico utilizando el protocolo “pair-ends” usando el secuenciador modelo Illumina HiSeq2000.

Tras el procesado inicial de las secuencias según el protocolo estándar de Illumina, versión 1.9, se obtuvieron más de 1.000.000 de pares de secuencias de entre 35 y 82 nucleótidos por

muestra. Su calidad fue analizada con FASTQC. En todos los casos, se obtuvo una calidad aceptable, no siendo necesario aplicar ningún filtrado adicional.

Las secuencias se alinearon con BWA (H. Li & Durbin, 2009), utilizando los parámetros por defecto para secuencias “pair-ends”: comandos “bwa aln” y “bwa sampe”. El genoma de referencia fue MG1655, obtenido de la base de datos Genbank (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U00096.3>

Los archivos de alineamientos en formato SAM fueron transformados a formato BAM (comprimido), ordenados e indexados con comandos de samtools (H. Li et al., 2009): “samtools view”, “samtools sort” y “samtools index”, respectivamente. Para la detección de polimorfismos en forma de sustituciones de nucleótidos (SNP) y pequeñas inserciones y deleciones (INDEL) se utilizaron los comandos de samtools “mpileup” y “bcftools”. En esta fase, no se aplicó ningún filtro de cobertura ni de calidad mínima. El resultado se obtuvo en forma de archivos VCF.

Para la anotación de los polimorfismos obtenidos, se utilizó snpEff (Cingolani et al., 2012), que detecta el efecto de las mutaciones en la secuencia de genes y proteínas, y clasifica los resultados en función de su potencial impacto fisiológico. Para la anotación de mutaciones en zonas upstream y downstream de los genes se consideró un tamaño de dichas zonas de 200 nucleótidos.

Los resultados obtenidos fueron filtrados y analizados de forma interactiva gracias a un visualizador desarrollado en el servicio de Genómica Computacional del CNB. Así se consideraron relevantes los polimorfismos con una calidad mínima calculada por samtools QC>30 y un impacto biológico según snpEff de “MODERATE” o “HIGH”

3.13 Trayectorias evolutivas

La determinación de las trayectorias evolutivas se realizó mediante la amplificación y secuenciación de los genes de interés de colonias aisladas a partir de diferentes tiempos en el proceso de evolución. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron comparadas con las secuencias de sus ancestros.

3.14 Construcción de cepas *E. coli* mutantes

La construcción de las cepas mutantes de *E. coli* MG1655 se basó en la expresión de la endonucleasa I-SceI. Para esto, los genes de interés fueron amplificados mediante PCR a partir de la cepa CIM8M y fueron clonados en el vector suicida pGE (Kan^R) (Piñero-Lambea et al., 2015). La cepa MG1655 fue transformada con el plásmido pACBSR (Cm^R), el cual expresa I-SceI y proteínas λ-red bajo el promotor P_{BAD}, inducible con L-arabinosa. Células de MG1655 pACBSR fueron transformadas con el vector pGE con los fragmentos génicos de interés, para su inserción en el genoma. Los co-integrantes se seleccionaron en placas de agar LB

suplementado con kanamicina (50 µl/ml) y cloranfenicol (50 µl/ml), e incubados a 37 °C por 24 horas. A partir de colonias aisladas se inocularon matraces con medio LB suplementado con arabinosa a una concentración final de 0,4 % (p/v), y se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Tras el tiempo de incubación, 10 µl de cultivo se estriaron en placas de agar LB suplementado con cloranfenicol (50 µl/ml). Una vez crecidas, se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron tanto en agar LB suplementado con cloranfenicol y kanamicina, como en LB suplementado con cloranfenicol. A partir de lo anterior se seleccionaron las colonias que perdieron la resistencia a kanamicina. La selección de las cepas que integraron a su genoma la secuencia génica correspondiente a la cepa CIM8M se llevó a cabo mediante amplificación y secuenciación de los genes de interés. Una vez seleccionadas las cepas mutantes, se eliminó el plásmido pACBSR mediante pases consecutivos en medio mínimo M9 suplementado con glucosa en ausencia de antibiótico. La pérdida de este plásmido se confirmó mediante el cultivo de colonias aisladas en medio mínimo M9 glucosa y medio mínimo M9 glucosa suplementado con cloranfenicol.

3.15 Ensayo de evaluación de estrés oxidativo

La evaluación del estrés oxidativo en las cepas seleccionadas se realizó mediante citometría de flujo, utilizando el reactivo acetato de 2',7'-dicloro fluoresceína (Sigma-Aldrich Co., San Luis), el cual al oxidarse a 2',7'-dicloro fluoresceína, emite fluorescencia (Bass et al., 1983). Para la evaluación del estrés oxidativo, las cepas fueron crecidas a partir de un cultivo *overnight* en medio mínimo M9 suplementado con glucosa como única fuente de carbono hasta alcanzar una Abs_{595nm} de 0,3. Una vez alcanzada la absorbancia correspondiente, las cepas se trataron con gentamicina a una concentración equivalente a su CMI, así como también con peróxido de tert-butilo a una concentración final de 5 µM, durante tres horas. La producción de especies reactivas del oxígeno fue evaluada también en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. El tratamiento de las muestras y la medición de la emisión de fluorescencia se llevó a cabo según lo recomendado por Herrera y colaboradores (Herrera, Martinez, O'Conor, & Blanco, 2003), en un citómetro de flujo marca Miltenyl Biotec, modelo MACS Quant VYB (Bergisch Gladbach). Cada condición se evaluó en duplicado, al igual que cada muestra.

3.16 Efecto sobre la transcripción de *recA*

Para evaluar el efecto de las mutaciones en *fhuA*, *fusA* y *potA* sobre la transcripción desde el promotor de *recA* se utilizó el plásmido reportero oligocopia pSC101-*PrecA*::GFP (Ronen et al., 2002). La inducción de la transcripción se evaluó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina, y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y ciprofloxacino. Para ambos antibióticos se utilizaron

concentraciones equivalentes a 0,5 veces la CMI. Para todas las condiciones, los cultivos se inocularon a partir de cultivos *overnight* y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una Abs_{595nm} de 0,3. Una vez alcanzada la absorbancia correspondiente, las cepas se trataron con gentamicina y con ciprofloxacino a una concentración equivalente a 0,5 veces la CMI y se incubaron durante tres horas en agitación. Luego del período de incubación se evaluó la Abs_{595nm} y la emisión de , a una longitud de onda de 535nm de emisión y 485nm de excitación, de las muestras en un espectrofotómetro con detector de fluorescencia marca Tecan modelo Infinite M200. Cada condición fue evaluada en triplicado.

Resultados

4 Resultados

4.1 Evolución de *Escherichia coli* hacia la resistencia a Gentamicina

Con la finalidad de determinar las trayectorias evolutivas y los cambios genómicos que confieren resistencia al antibiótico gentamicina en *Escherichia coli*, en este trabajo se utilizaron como modelo de evolución las cepas *E. coli* MG1655 y su derivada MG1655 $\Delta dnaQ$. Esta última cepa corresponde a un mutante de delección del gen *dnaQ*, el cual codifica para la subunidad ϵ de la enzima DNA-polimerasa III de *E. coli*. Esta subunidad tiene por función la detección y corrección de errores tras el proceso de replicación del DNA, manteniendo la fidelidad de las hebras nacientes respecto al DNA molde (Takano, Nakabeppu, Maki, Horiuchi, & Sekiguchi, 1986). La construcción de la mutante $\Delta dnaQ$ se llevó a cabo mediante recombinación homologa del gen $\Delta dnaQ744::kan$ proveniente de la cepa JW0205 de la colección Keio de mutantes de delección (Baba et al., 2006) en la cepa *E. coli* MG1655, mediante el método establecido por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Una vez recombinado el fragmento en la cepa MG1655 y seleccionada la cepa con delección en *dnaQ*, se eliminó el *cassette* de resistencia a kanamicina (Datsenko & Wanner, 2000). Las cepas MG1655 y $\Delta dnaQ$ se adaptaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa a una concentración de 0,2 % (p/v). Esta adaptación se realizó mediante pases consecutivos de cultivos *overnight* a medio fresco, durante siete días, equivalentes a 56 generaciones.

La delección de la subunidad ϵ de la DNA-polimerasa III produce un fenotipo hipermutador en *E. coli* (Takano et al., 1986), por lo que la correcta construcción de la cepa *E. coli* MG1655 $\Delta dnaQ$ se corroboró mediante la amplificación y la electroforesis del gen *dnaQ*, así como también mediante la evaluación de su frecuencia de mutantes (Figura 4).

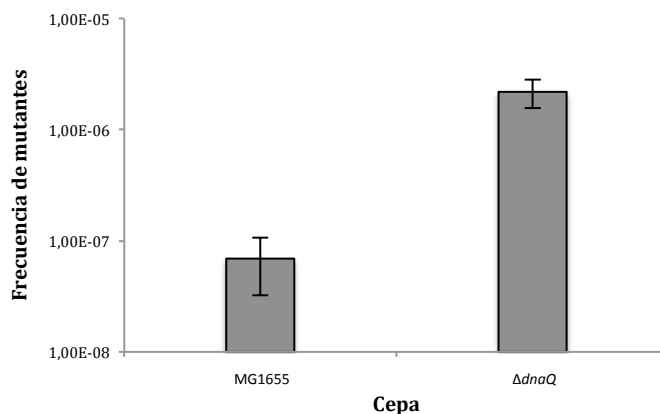


Figura 4. Frecuencia de mutantes de cepas ancestrales en rifampicina. La frecuencia de mutantes de las cepas MG1655 y $\Delta dnaQ$ se evaluó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y rifampicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

La cepa MG1655 y su derivada $\Delta dnaQ$ fueron caracterizadas según su sensibilidad a antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias. Los resultados obtenidos mediante la determinación de la concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) indican que ambas cepas ancestrales son sensibles a todos los antimicrobianos evaluados (Tabla 4).

Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)									
	GEN	AMP	CMF	COL	CIP	FOS	TET	RIF	TRI	BEt
MG1655	0,25	16	4	1	0,008	0,25	0,5	4	0,5	64
$\Delta dnaQ$	0,25	32	4	1	0,016	1	2	4	0,5	32

Tabla 4. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas ancestrales. Concentración mínima inhibitoria determinada mediante el método por dilución de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias: gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BEt).

Tanto MG1655 como $\Delta dnaQ$, previamente adaptadas al medio, fueron crecidas en quimiostato en presencia de dosis crecientes de gentamicina durante al menos cuarenta y dos días. Para ambas cepas, el procedimiento consistió en la exposición inicial a una dosis de $0,03 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina para finalmente llegar a una concentración de $256 \mu\text{g/ml}$. La dosis final equivale a 1024 veces la CMI de gentamicina para ambas cepas. La utilización de cultivos continuos del tipo quimiostato permitió que los ensayos de evolución se llevaran a cabo bajo condiciones metabólicas y fisiológicas homogéneas en medio mínimo M9 suplementado con glucosa como única fuente de energía y carbono. De esta manera, la única variante correspondió a la presencia y concentración del antibiótico. La utilización de quimiostato como sistema de cultivo permitió también mantener las condiciones de crecimiento bacteriano constantes, es decir, las células se encontraron durante todo el período de exposición a gentamicina en fase exponencial. Por otra parte, este sistema permitió la selección de aquellos clones derivados de la cepa ancestral con una velocidad de crecimiento igual o mayor velocidad de dilución del cultivo continuo.

Con el fin de llevar los cultivos continuos a su estado de equilibrio, se determinaron, de manera empírica, los parámetros a los cuales la dilución (D) del cultivo igualaba la velocidad de crecimiento (μ), donde D está definido por el coeficiente entre el flujo de entrada y salida de medio (F) y el volumen total del quimiostato (Hoskisson & Hobbs, 2005).

$$D = F/V = 0,014 \text{ l h}^{-1}/0,04 \text{ l}$$

$$D = 0,35 \text{ h}^{-1}$$

Debido a que al alcanzar el equilibrio

$$D = \mu_{\max}$$
$$\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$$

A partir de D se determinó el tiempo medio de residencia TMR definido como

$$\text{TMR} = 1/D$$
$$\text{TMR} = 2,86 \text{ h}$$

Estos parámetros se fijaron al inicio del ensayo en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración de 0,03 µg/ml. Una vez alcanzada la CMI de gentamicina de las cepas ancestrales, se ajustaron los parámetros previamente mencionados, debido a una disminución en la velocidad de crecimiento de las cepas utilizadas en el presente estudio.

En este contexto, tenemos que a partir de la dosis de gentamicina correspondiente a 0,25 µg/ml los parámetros fueron los siguientes:

$$D = F/V = 0,0096 \text{ l h}^{-1}/0,04 \text{ l}$$
$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$
$$\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$$
$$\text{TMR} = 4,16 \text{ h}$$

A partir de esta dosis de gentamicina, dichos parámetros se mantuvieron constantes hasta finalizar el ensayo de evolución.

Una vez alcanzada la dosis máxima establecida, se procedió a obtener muestras desde los quimiostatos para sembrar placas Petri conteniendo agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración igual a la alcanzada durante el final de la experiencia de evolución en cultivo continuo.

4.2 MG1655

4.2.1 Caracterización fenotípica de colonias aisladas desde proceso de evolución

Para la cepa MG1655 se aislaron veintidós cepas resistentes a gentamicina desde de las placas sembradas a partir del último paso de la evolución en quimiostato (Tabla 5). De un total de cuatro réplicas, sólo dos de éstas presentaron crecimiento una vez alcanzada la CMI de gentamicina de su ancestro en los cultivos. Las colonias obtenidas se seleccionaron basándose en sus diferencias morfológicas, para ser posteriormente caracterizadas fenotípicamente mediante la evaluación de tres parámetros: sensibilidad a antimicrobianos, capacidad hemolítica y formación de biofilm.

Nomenclatura de las cepas aisladas derivadas de MG1655 resistentes a Gentamicina	
CIM5A	CIM5T
CIM5C	CIM8B
CIM5F	CIM8C
CIM5G	CIM8D
CIM5H	CIM8E
CIM5I	CIM8F
CIM5K	CIM8G
CIM5M	CIM8K
CIM5N	CIM8L
CIM5P	CIM8M
CIM5R	CIM8N

Tabla 5. Cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina. Cepas aisladas desde cultivos finales en quimiostato en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (256 µg/ml). La nomenclatura de las cepas se basa en quien las aisló (CI), su cepa ancestral MG1655 (M), la replica a partir de la cual se aislaron (Nº), y finalmente la colonia aislada (Letra).

4.2.1.1 Sensibilidad a antimicrobianos

Las cepas resistentes a gentamicina se caracterizaron según su sensibilidad a diferentes antimicrobianos, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (Anexo I, Tabla A1). La sensibilidad a bromuro de etidio se utilizó como método de detección de la activación de bombas de expulsión (Viveiros et al., 2008). Los resultados indican que el total de clones aislados presentan una concentración mínima inhibitoria de gentamicina de 512

µg/ml, siendo esta dosis más de dos mil veces mayor que la de su ancestro. Además de la resistencia a gentamicina, todos los clones aislados presentan resistencia a rifampicina y fosfomicina, mientras que en el 68% de las cepas se observa una mayor sensibilidad a cloranfenicol (Tabla 6). Los resultados obtenidos mediante la determinación de la CMI a trimetoprim, indican que el 45% de las cepas aisladas presentan una mayor sensibilidad a este compuesto (Tabla 6 y Tabla 7).

Antimicrobiano	% de cepas incrementaron resistencia (n=22)	% cepas incrementaron sensibilidad (n=22)
GEN	100	0
AMP	0	0
CMF	0	68
COL	0	0
CIP	0	14
FOS	100	0
TET	0	0
RIF	100	0
TRI	0	45
BET	0	0,09

Tabla 6. Variación de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655. Porcentaje de cepas que presentan variación en sus concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes antimicrobianos respecto a su ancestro MG1655. Se consideró variación toda CMI que presentara más de dos diluciones de diferencia respecto a la cepa ancestral. Los antimicrobianos evaluados fueron: gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BET).

Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)									
	GEN	AMP	CMF	COL	CIP	FOS	TET	RIF	TRI	BEt
MG1655	0,25	16	4	1	0,008	0,25	0,5	4	0,5	64
CIM5A	512	16	0,25	2	≤0,001	≥8	0,5	16	0,25	8
CIM5H	512	16	0,25	2	0,002	≥8	0,5	≥64	0,25	8
CIM5I	512	8	0,5	2	0,008	≥8	0,5	≥64	0,13	8
CIM5M	512	32	0,5	2	0,008	≥8	0,5	≥64	0,25	32
CIM5P	512	16	≤0,13	2	≤0,001	≥8	0,5	≥64	0,13	64
CIM5R	512	16	≤0,13	2	≤0,001	≥8	0,25	≥64	0,13	8
CIM8B	512	4	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,25	≥64	0,13	32
CIM8D	512	8	1	1	0,008	≥8	0,06	≥64	0,25	8
CIM8E	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	1	≥64	0,13	8
CIM8F	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,5	≥64	0,13	8
CIM8G	512	4	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,125	≥64	0,13	8
CIM8K	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,5	≥64	0,25	8
CIM8L	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	1	≥64	0,13	32
CIM8M	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,5	≥64	0,13	64
CIM8N	512	8	≤0,13	0,5	0,008	≥8	0,5	≥64	0,25	8

Tabla 7. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BEt), que presentan mayor diferencia tanto entre el total de cepas resistentes como respecto a su ancestro.

4.2.1.2 Hemólisis

Debido a la relación entre resistencia a aminoglicósidos y el fenotipo de colonias pequeñas denominado SCV, del inglés *small colony variants*, y la variación en los perfiles de hemólisis de este fenotipo en diferentes especies bacterianas (Balwit et al., 1994; Zahra et al., 2013), se determinó la capacidad hemolítica de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina mediante el crecimiento en agar Columbia suplementado con sangre de cordero. El perfil de hemólisis de las cepas aisladas muestra que trece de las cepas evolucionadas conservaron su fenotipo alfa hemolítico, mientras que nueve de ellas han perdido su capacidad hemolítica (Tabla 8).

Cepa	Hemolisis			Cepa	Hemolisis		
	alfa	beta	Ausencia		alfa	beta	Ausencia
MG1655	+	-	-	CIM5T	+	-	-
CIM5A	+	-	-	CIM8B	+	-	-
CIM5C	+	-	-	CIM8C	-	-	+
CIM5F	+	-	-	CIM8D	+	-	-
CIM5G	+	-	-	CIM8E	-	-	+
CIM5H	-	-	+	CIM8F	-	-	+
CIM5I	-	-	+	CIM8G	+	-	-
CIM5K	-	-	+	CIM8H	+	-	-
CIM5M	-	-	+	CIM8K	-	-	+
CIM5N	+	-	-	CIM8L	+	-	-
CIM5P	+	-	-	CIM8M	+	-	-
CIM5R	-	-	+	CIM8N	+	-	-

Tabla 8. Perfil de hemólisis de las cepas derivadas de MG1655. Capacidad hemolítica evaluada mediante cultivo en agar Columbia 5% sangre de cordero.

4.2.1.3 Formación de biofilm

Con el fin de determinar si la resistencia a gentamicina de las cepas aisladas se relaciona con la formación de biofilm, como ha sido previamente descrito para antibióticos de diferentes familias (Costerton et al., 1987), se evaluó su capacidad de formar biofilm en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina. La Figura 5 muestra el patrón de formación de biofilm de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina, tanto en presencia como en ausencia de una dosis subinhibitoria del antibiótico (64 µg/ml). En la gráfica es posible apreciar que en ausencia de gentamicina las cepas CIM5B, CIM5N, CIM8D, CIM8F, CIM8G, CIM8H, CIM8K, CIM8L y CIM8N presentan una mayor capacidad de formación de biofilm que en presencia del antibiótico. El mayor incremento en la formación de biofilm, en ambas condiciones, se observa para CIM8B, CIM8C, CIM8D, CIM8E, CIM8F, CIM8G, CIM8H, CIM8K, CIM8L y CIM8N.

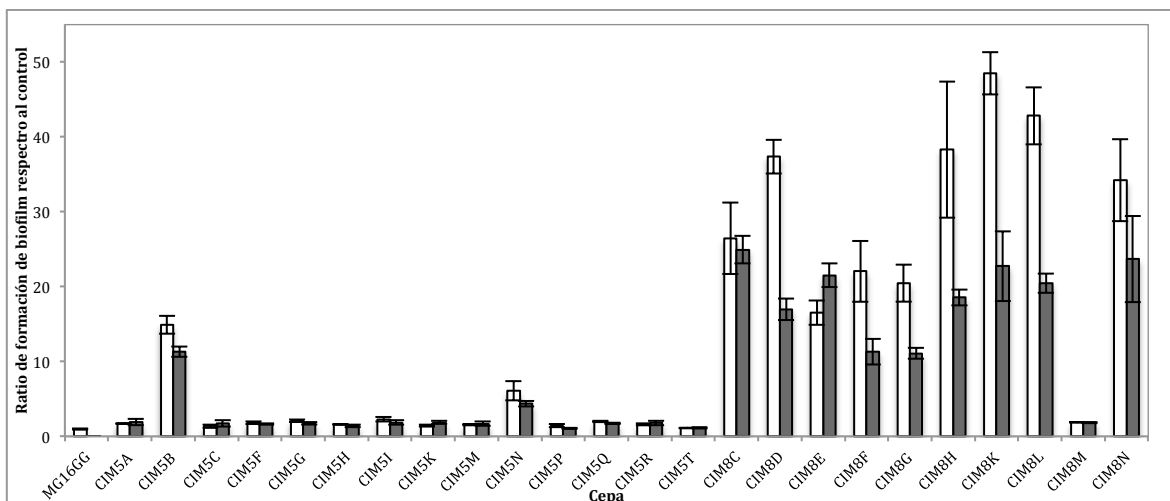


Figura 5. Formación del biofilm de las cepas derivadas de MG1655. Formación de biofilm respecto a la cepa ancestral MG1655 en medio mínimo M9 glucosa (□) y en medio mínimo M9 glucosa suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración final de 64 µg/ml (■). Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro replicas independientes.

A partir de la caracterización fenotípica de las cepas derivadas de MG1655 se seleccionaron cuatro clones para su posterior análisis. Los clones seleccionados fueron: CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M. Estas cepas representan diferentes fenotipos presentes en las cepas aisladas a partir del ensayo de evolución. La cepa CIM5H se seleccionó debido a su aumento en la sensibilidad a cloranfenicol y bromuro de etidio. La cepa CIM5N se seleccionó debido a su aumento en la sensibilidad a cloranfenicol y a su aumento en la capacidad de formación de biofilm. La cepa CIM8C se seleccionó debido a la pérdida de la capacidad hemolítica, y a que no presenta variaciones en las CMI a los diferentes antimicrobianos a excepción de gentamicina, mientras que la cepa CIM8M se seleccionó debido a su aumento en la sensibilidad a cloranfenicol, así como también a un leve aumento en la capacidad de formación de biofilm.

4.2.2 Caracterización fenotípica de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina seleccionadas: CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M.

4.2.2.1 Frecuencia de mutantes

Para analizar si la adaptación y resistencia a gentamicina afectó el fenotipo normomutador de las células, se determinó la frecuencia de mutantes en placas de agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y ácido nalidíxico, debido a que todas las cepas derivadas de MG1655 presentaron un fenotipo resistencia a rifampicina. Tanto la cepa ancestral como las cepas derivadas de MG1655 son sensibles a ácido nalidíxico. Los resultados indican que

CIM5H y CIM5N incrementaron su frecuencia de mutación en dicho antibiótico respecto a la cepa ancestral, en medio y dos ordenes de magnitud, respectivamente (Figura 6).

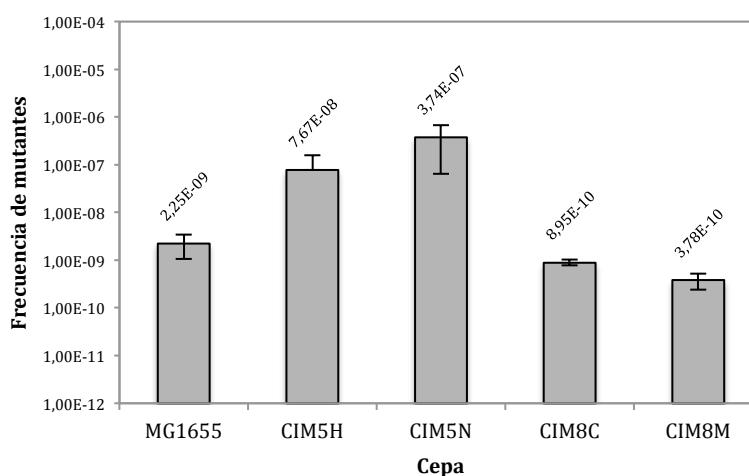


Figura 6. Frecuencia de mutantes de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Frecuencia de mutantes en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y ácido nalidíxico a una concentración de 40 µg/ml. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicas independientes.

4.2.2.2 Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno

Durante la última década se ha establecido una relación entre resistencia a antibióticos y estrés oxidativo (Albesa, Becerra, Battan, & Paez, 2004; Dwyer, Kohanski, Hayete, & Collins, 2007; Goswami et al., 2006; Kohanski, Dwyer, Hayete, Lawrence, & Collins, 2007). Debido a esto, se evaluó la sensibilidad de las cepas seleccionadas a peróxido de hidrógeno mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa inoculado tanto desde cultivos en fase estacionaria como desde fase exponencial. Los halos de inhibición obtenidos indican un aumento en la sensibilidad a peróxido de hidrógeno en las cuatro cepas analizadas, en ambas condiciones experimentales (Figura 7).

En las cepas resistentes a gentamicina se observa un aumento en la sensibilidad a peróxido de hidrógeno al realizar el ensayo desde cultivos en fase exponencial, a diferencia de la cepa ancestral, la cual no presenta diferencias en la sensibilidad a peróxido de hidrógeno en ambas condiciones experimentales.

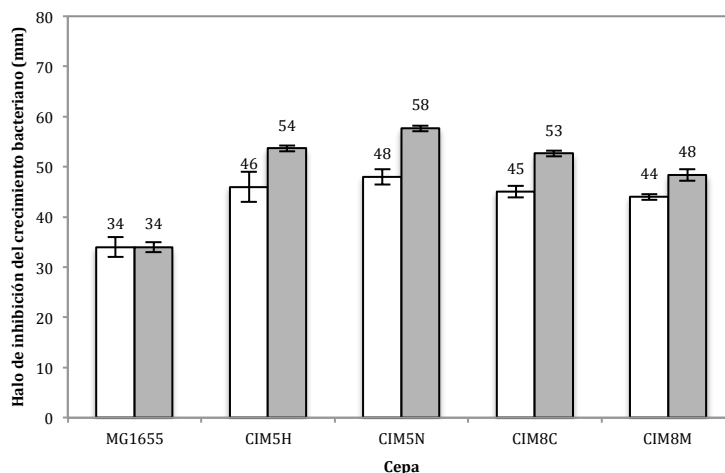


Figura 7. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. El halo de inhibición del crecimiento bacteriano se evaluó en presencia de 26 μ moles de peróxido de hidrógeno en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Este ensayo se realizó utilizando, de manera independiente, inóculos provenientes de cultivos en fase estacionaria (\square) e inóculos provenientes desde cultivos bacterianos en fase exponencial (\blacksquare). Las barras de error representan la desviación estándar entre tres réplicas independientes.

4.2.2.3 Perfil metabólico

Para determinar el efecto de la evolución en presencia de gentamicina sobre el metabolismo de MG1655, se determinó la capacidad de utilizar diferentes compuestos orgánicos como única fuente de energía y carbono, mediante el sistema de microplacas Biolog GN2. La evaluación de la capacidad metabólica de las cepas derivadas de MG1655 de utilizar diferentes compuestos orgánicos como única fuente de energía y carbono (Anexo I, Tabla 2A) reveló que las cepas resistentes a gentamicina redujeron su capacidad de metabolizar compuestos orgánicos, respecto a la cepa ancestral (Figura 8).

Los resultados indican que la mayor diferencia en el metabolismo de las cepas resistentes respecto a su ancestro se relaciona con el metabolismo de aminoácidos y ácidos orgánicos. Las cepas que presentan una mayor disminución en la capacidad metabólica son CIM8C y CIM8M, principalmente para ácido orgánicos, aminoácidos y nucleósidos (Tabla 9).

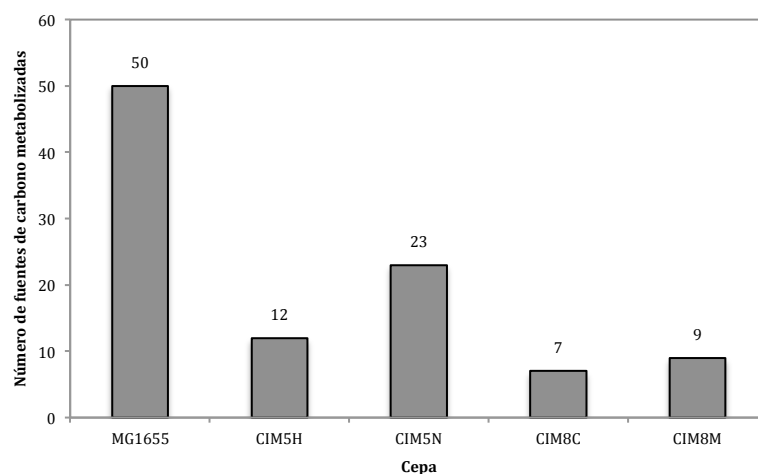


Figura 8. Metabolización de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Variación en el número total de compuestos orgánicos metabolizados por la cepas aisladas y la cepa ancestral MG1655. El perfil metabólico de las cepas se llevó a cabo mediante el sistema de microplacas Biolog GN2.

	Numero total de compuesto metabolizados					
	Azúcares	Ácidos orgánicos y sus derivados	Aminoácidos y derivados	Nucleósidos	Alcohol	Fosfatos
MG1655	19	14	10	3	1	3
CIM5H	8	3	0	1	0	2
CIM5N	12	6	1	1	1	3
CIM8C	4	3	0	0	1	1
CIM8M	8	0	0	0	1	1

Tabla 9. Capacidad metabólica de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Variaciones en la capacidad metabólica de las cepas derivadas de MG1655 de compuestos pertenecientes a diversos grupos estructurales, evaluada mediante el sistema GN2 de Biolog.

4.2.2.4 Análisis enzimático

La actividad enzimática de las cepas resistentes a gentamicina se evaluó utilizando el sistema API20E de Biomerieux. Los resultados (Anexo I, Tabla A3) indican que las cepas CIM8C y CIM8M no presentan cambios en la actividad enzimática respecto a su ancestro, a excepción de la pérdida de la actividad desaminasa. La cepa CIM8C, junto con la actividad desaminasa, ha perdido la capacidad de fermentar u oxidar la amigdalina. Tanto la cepa CIM5H como CIM5N han perdido la actividad desaminasa y de fermentación u oxidación de desorbitol, ramnosa y melibiosa. A su vez, la cepa CIM5N ha perdido la actividad lisina descarboxilasa respecto a su cepa ancestral.

4.2.2.5 Crecimiento bacteriano

Para determinar si las cepas aisladas a partir del ensayo de evolución en presencia de gentamicina presentan variaciones respecto al crecimiento bacteriano en comparación a su ancestro, se realizaron curvas de crecimiento de las mismas, tanto en medio mínimo M9 suplementado con glucosa como en medio mínimo M9 glucosa suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9). Las curvas de crecimiento muestran que las cepas derivadas de MG1655 presentan menor crecimiento que su ancestro, así como también mayor tiempo de duplicación. Las cepas CIM5H y CIM5N presentan una menor diferencia en su velocidad de crecimiento en presencia y ausencia de gentamicina, mientras que para las cepas CIM8C y CIM8M la velocidad de crecimiento disminuye en presencia del antibiótico en un porcentaje mayor al 60% (Tabla 10).

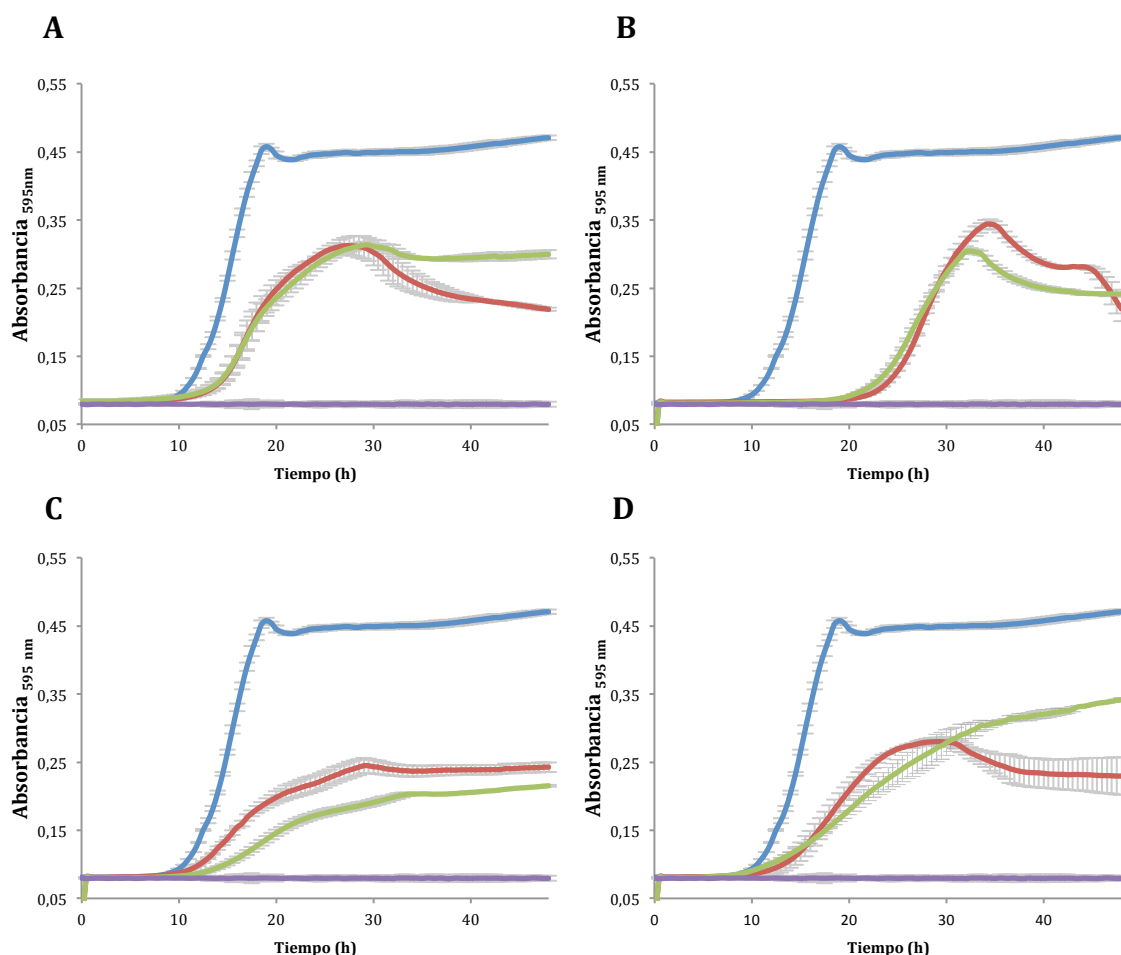


Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Curva de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (—) y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$ (—). A: CIM5H; B: CIM5N; C: CIM8C y D: CIM8M. Como control se utilizó la cepa MG1655 en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (—) y en medio mínimo suplementado con glucosa y gentamicina (64 $\mu\text{g/ml}$) (—). Las barras de error representan la desviación estándar entre tres replicas independientes.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)	
	Sin Gentamicina	Gentamicina 64 µg/ml
MG1655	181	s/c
CIM5H	223	243
CIM5N	225	270
CIM8C	337	540
CIM8M	331	552

Tabla 10. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. El tiempo de duplicación de las cepas derivadas de MG1655 se determinó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina, mediante la utilización del programa informático GrowthRates. s/c: sin crecimiento.

4.2.2.6 Morfología celular

Los cambios en la morfología celular de las cepas resistentes a gentamicina se determinaron mediante microscopía de contraste de fases. Éstos se analizaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa en presencia y ausencia de gentamicina. Para esto se utilizaron cultivos bacterianos en fase exponencial, en medio mínimo M9 suplementado con glucosa en presencia y ausencia de gentamicina a una concentración subinhibitoria de 64 µg/ml. En la figura 10 es posible apreciar que las cepas CIM5H, CIM8C y CIM8M no presentan cambios morfológicos respecto al ancestro. Por su parte, CIM5N presenta células más alargadas, tanto en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (Figura 10-E) como en medio mínimo suplementado con glucosa y gentamicina (Figura 10-F).

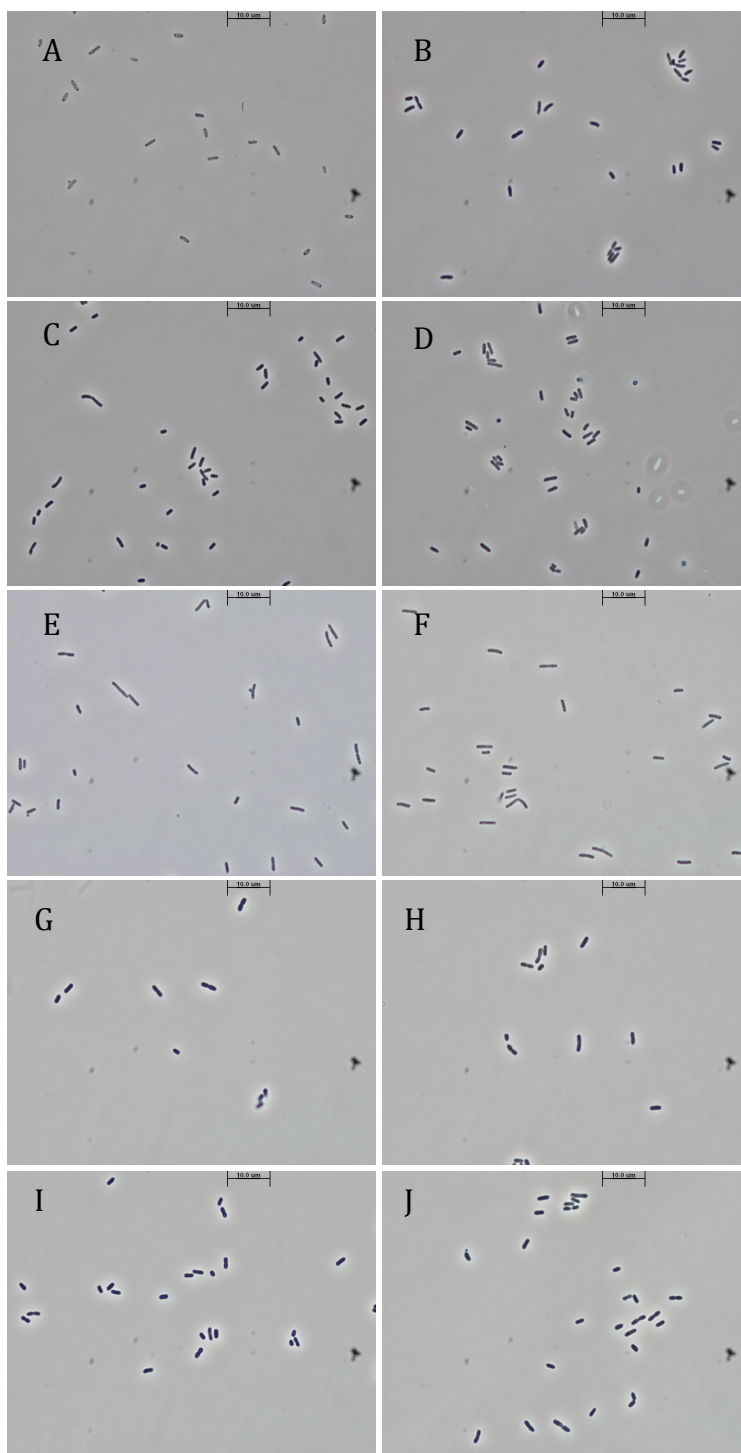


Figura 10. Morfología celular de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Para evaluar los cambios en la morfología celular de las cepas resistentes a gentamicina, éstas fueron analizadas mediante microscopía de contraste de fases, en fase exponencial en medio mínimo M9 glucosa. **A:** MG1655, sin gentamicina. **B:** MG1655, gentamicina 0,03 µg/ml. **C:** CIM5H, sin gentamicina. **D:** CIM5H, gentamicina 64 µg/ml. **E:** CIM5N, sin gentamicina. **F:** CIM5N, gentamicina 64 µg/ml. **G:** CIM8C, sin gentamicina. **H:** CIM8C, gentamicina 64 µg/ml. **I:** CIM8M, sin gentamicina. **J:** CIM8M, gentamicina 64 µg/ml.

4.2.3 Caracterización genotípica de las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina seleccionadas CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M.

Las cepas resistentes a gentamicina seleccionadas se caracterizaron genotípicamente mediante la secuenciación de los genomas completos de CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M. Como referencia, se secuenció la cepa MG1655 utilizada en este estudio. Las secuencias de las cepas resistentes a gentamicina fueron analizadas y comparadas con la secuencia de su ancestro para la identificación de modificaciones genotípicas que sólo estuvieran presentes en las cepas resistentes a gentamicina (Anexo II). Los resultados obtenidos indican que las cepas CIM5H y CIM5N presentan un mayor número de mutaciones respecto a CIM8C y CIM8M (Tabla 11). El análisis de las secuencias obtenidas indica que las cepas CIM5H y CIM5N presentan una mutación no sinónima en el gen *dnaQ* que codifica para la subunidad ϵ de la DNA-polimerasa III en *E. coli*. Esta subunidad tiene por función la detección y corrección de errores introducidos durante la replicación, para maximizar la fidelidad del material genético (Echols et al., 1983; Scheuermann et al., 1983). En las cepas CIM5H y CIM5N, el aminoácido histidina en posición 162 ha sido sustituido por una glutamina. El residuo H162 es un aminoácido altamente conservado que constituye el sitio catalítico de esta enzima (Cisneros et al., 2009), por lo que mutaciones en este residuo generan un incremento en la frecuencia de mutantes (Strauss et al., 1997). Estos resultados se relacionan con las mayores frecuencias de mutantes obtenidas para las cepas CIM5H y CIM5N. Para la cepa CIM5N se observa un ligero aumento en la frecuencias de mutantes en ácido nalidíxico respecto a CIM5H (Figura 6). Lo anterior podría relacionarse con que esta cepa, además de sustitución en posición 162 de *dnaQ*, presenta la sustitución C314Y en MutY. MutY es una enzima con actividad adenina y guanina glicosilasa y su principal función es proteger el DNA contra el daño oxidativo (Au, Clark, Miller, & Modrich, 1989). Residuos en el extremo C-terminal de la proteína han demostrado estar involucrados en el reconocimiento de 8-oxo guanina y en la actividad catalítica (L. Li & Lu, 2003), por lo que la sustitución observada en CIM5N podría afectar la actividad de esta enzima y, por consiguiente, aumentar la frecuencia de mutantes.

Cepas	Mutaciones Totales	Polimorfismo de nucleótido simple no sinónimo	Mutaciones de alto impacto
MG1655	9	2	2
CIM5H	345	178	30
CIM5N	636	326	50
CIM8C	29	11	5
CIM8M	22	8	4

Tabla 11. Mutaciones en las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Resumen del número y tipo de mutaciones presentes en las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655.

Si bien las cuatro cepas derivadas de MG1655 presentan un aumento en la resistencia a fosfomicina, no ha sido posible establecer una relación entre este fenotipo y los genotipos bacterianos, ya que no se observan mutaciones en los genes previamente descritos como responsables de esta resistencia: *glpT* y *uhpT*, *murA*, *cya*, *uhpA* y *ptsI* (Takahata et al., 2010).

Los resultados obtenidos mediante la secuenciación de los genomas de estas cepas han permitido establecer que todas las cepas presentan mutaciones en los genes *fhuA*, *fusA* y *rpoB*, y en los operones *atp*, *cyo* y *potABCD* (Tabla 12).

Cepa	Operón	Gen	Tipo de Mutación	Posición
CIM5H	beta	<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	H526Y
		<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q835G
		<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	I966V
	<i>str</i>	<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	A608E
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	391 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoC</i>	Cambio en el marco de lectura	190 (DEL)
		<i>cyoE</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	N73S
		<i>atpA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	N358K
	<i>atp</i>	<i>atpB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	I248N
		<i>atpD</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q366L
CIM5N	beta	<i>potB</i>	Ganancia de codón de término	58 (TERM)
		<i>potB</i>	Ganancia de codón de término	T193M
		<i>potC</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	A187V
	beta	<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	H526Y
		<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	I966V
		<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	A608E
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	391 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoC</i>	Cambio en el marco de lectura	190 (DEL)
		<i>cyoE</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	N73S
		<i>atpB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	I248N
CIM8C	beta	<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	N16Y
		<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	A187V
		<i>potC</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	A187V
	beta	<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	H526Y
		<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	F593L
		<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	197 (INS)
	<i>cyo</i>	<i>cyoA</i>	Ganancia de codón de término	67 (TERM)
	<i>atp</i>	<i>atpG</i>	Cambio en el marco de lectura	245 (DEL)
	<i>potABCD</i>	<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L
		<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L
CIM8M	beta	<i>rpoB</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	H526Y
		<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	F593L
		<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	197 (INS)
	<i>cyo</i>	<i>cyoA</i>	Ganancia de codón de término	67 (TERM)
	<i>atp</i>	<i>atpG</i>	Cambio en el marco de lectura	245 (DEL)
		<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	M247T
		<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	M247V
	<i>potABCD</i>	<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L
		<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L
		<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L

Tabla 12. Mutaciones comunes en las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Mutaciones en genes y operones comunes para todas las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina.

4.2.3.1 Mutaciones comunes

4.2.3.1.1 Factor de elongación G. Las cuatro cepas derivadas de MG1655 presentan una mutación en el gen *fusA*, el cual codifica para el factor de elongación G (EF-G) en *E. coli* (Zengel, Archer, & Lindahl, 1984), y se encuentra dentro del operón *str* que codifica para las

proteínas ribosomales S12 y S7, y los factores de elongación EF-G y EF-Tu (Post & Nomura, 1980). EF-G es una proteína con actividad GTPasa (Nishizuka & Lipmann, 1966) que cataliza la translocación de el peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P durante la traducción (Erbe & Leder, 1968). EF-G no sólo actúa a nivel de la translocación, sino que también está involucrada en el proceso de *reciclaje* del ribosoma donde, junto con el factor de reciclaje del ribosoma (RRF o RF3), se une al ribosoma 70S, desestabilizando las uniones entre las subunidades 30S y 50S para producir la separación de ambas subunidades (N. Gao et al., 2005; Hirokawa et al., 2006; Kiel et al., 2007; Zavialov et al., 2005). La unión de algunos antibióticos aminoglicósidos, como neomicina, kanamicina y gentamicina, al ribosoma 70S inhiben el proceso de translocación y estabilizan la unión de EF-G al ribosoma, inhibiendo el proceso de *reciclaje* (Aaron et al., 1980; Campuzano, Vazquez, & Modolell, 1979; Misumi, Nishimura, Komai, & Tanaka, 1978).

Para las cepas CIM8C y CIM8M las mutaciones en EF-G se localizan en el dominio IV de la proteína, mientras que para las cepas CIM5H y CIM5N se encuentran en el dominio V (Ævarson et al., 1994). Ambos dominios son fundamentales tanto para la actividad de translocación como para el *reciclaje* del ribosoma (Savelsbergh, Matassova, Rodnina, & Wintermeyer, 2000). En la actualidad se ha identificado que mutaciones en esta subunidad se relacionan con un aumento en la resistencia a aminoglicósidos hasta concentraciones de 15 µg/ml. Bajo esta concentración, estos antibióticos se unen al ribosoma en una relación estequiométrica de 2:1, mientras que sobre ésta esta proporción se pierde llegando a unirse cinco moléculas de aminoglicósidos por ribosoma. Estos antibióticos producirían un aumento en la afinidad del tRNA por el sitio A del ribosoma, bloqueando así la translocación (Cundliffe, 1990). En este contexto, mutaciones puntuales en *fusA* permitirían a EF-G revertir este bloqueo a bajas concentraciones de antibiótico, restableciendo la coordinación entre los procesos de selección del aminoacil-tRNA, la formación de los enlaces peptídicos y la translocación mediante la disminución de la velocidad de translocación (Hou, Lin, Sharer, & March, 1994). Debido a la anterior, mutaciones en este gen producen defectos en el crecimiento bacteriano, específicamente a nivel de la síntesis proteica (Hou, Lin, et al., 1994; Savelsbergh et al., 2000). Mutaciones puntuales en *fusA* se relacionan también a la resistencia al ácido fusídico (Johanson & Hughes, 1994; Laurberg et al., 2000; Noren, Akerlund, Wullt, Burman, & Unemo, 2007; Norstrom, Lannergard, & Hughes, 2007).

4.2.3.1.2 Citocromo *bo₃* oxidasa. Las cepas derivadas de MG1655 resistentes a gentamicina presentan mutaciones en diferentes genes pertenecientes al operón *cyoABCDE*. Este operón codifica para la citocromo *bo₃* ubiquinol oxidasa (CyoABCD) y para una hemo O sintetasa (CyoE) que es esencial para el correcto ensamblaje de la oxidasa. La citocromo *bo₃* ubiquinol oxidasa es una oxidasa terminal de la cadena transportadora de electrones que cataliza la oxidación de ubiquinol y la reducción del oxígeno molecular presente en la célula para dar origen a la formación de agua (H. Nakamura, Saiki, Mogi, & Anraku, 1997). Esta enzima está formada por cuatro subunidades, y todas ellas son fundamentales para su correcto funcionamiento. Junto con la citocromo *bd-I* oxidasa, contribuye a la generación de la fuerza protón motriz (FPM) en la célula bacteriana mediante su actividad como bomba de protones,

y su mayor actividad catalítica se observa en presencia de altas concentraciones de oxígeno (Hosler et al., 1993; Kita, Kasahara, & Anraku, 1982). Otros de los factores que afectan la expresión de esta oxidasa son la fuente de carbono y la concentración de hierro, y Fnr reprime su expresión en anaerobiosis (Cotter, Chepuri, Gennis, & Gunsalus, 1990). El centro catalítico de la enzima, donde ocurre la reducción del oxígeno molecular, está formado por dos grupos hemo y cobre (Abramson et al., 2000). La generación de la FPM es fundamental para la célula, ya que contribuye directamente en los procesos energéticos mediante la asociación a la enzima ATP-sintasa, así como también mediante la generación del potencial de membrana (Yasuhiro Anraku & Gennis, 1987; Matsushita, Patel, & Kaback, 1984), el cual es necesario para la entrada de diferentes compuestos a la célula como es el caso de los aminoglicósidos.

Las cepas CIM5H y CIM5N presentan alteraciones en los genes *cyoC* y *cyoE*, donde CyoC ha sufrido la delección de una timina en posición 596, produciendo un cambio en el marco de lectura a partir del residuo V190 de la proteína, el cual se encuentra en una región conservada de la misma. Para ambas cepas, el residuo N73 de CyoE ha sido sustituido por una serina. N73 no es un residuo conservado, sin embargo, se encuentra inserto en una región altamente conservada (Saiki, Mogi, Hori, Tsubaki, & Anraku, 1993). Las cepas CIM8C y CIM8M presentan la introducción de un codón de término en posición 67 de CyoA. *cyoA* codifica para la subunidad II de la citocromo *bo₃* ubiquinol oxidasa, y en ella se ha identificado uno de los sitios de unión a ubiquinol (Welter et al., 1994). Debido a que todas las subunidades son necesarias para el funcionamiento de esta oxidasa terminal, esta mutación tendría un alto impacto sobre el complejo enzimático.

Debido a que la segunda etapa de entrada de aminoglicósidos a la célula bacteriana requiere de la FPM y de la generación del potencial de membrana, y alteraciones en la cadena transportadora de electrones han sido asociadas a la resistencia a estos compuestos (Bryan & Kwan, 1983; Miller et al., 1980), las mutaciones presentes en la enzima citocromo *bo₃* ubiquinol oxidasa contribuirían al fenotipo de resistencia a gentamicina, debido a una disminución de la permeabilidad celular al antibiótico. Los fenotipos bacterianos *small colony variants* (SCV) han sido asociados a defectos en la cadena transportadora de electrones (McNamara & Proctor, 2000; Miller et al., 1980), sin embargo, no se han identificado mutaciones en este operón que den origen a la resistencia a aminoglicósidos en estos fenotipos bacterianos.

4.2.3.1.3 FhuA. Otro de los genes mutados en todas las cepas resistentes a gentamicina es *fhuA*. FhuA es un transportador de membrana de sideróforos del tipo ferricromo (Hantke & Braun, 1975). Además de su actividad transportadora de ferricromo-Fe³⁺, FhuA actúa como transportador de albomicina y rifamicina, así como también como receptor colicina M, microcina 25 y los fagos T1, T5 y ϕ 80 (V. Braun, 2009; V. Braun, Hancock, Hantke, & Hartmann, 1976; Salomon & Farias, 1993). Este sistema de transporte de ferricromo se asocia a TonB que actúa como un transductor de energía proveniente del gradiente electroquímico de la membrana interna para el transporte de ferricromo a través de FhuA (Killmann, Herrmann, Torun, Jung, & Braun, 2002). La expresión de *fhuA* se encuentra regulada por la

concentración intracelular de hierro y el regulador de ingreso de hierro Fur, donde la unión de Fur-Fe a la región reguladora reprime la expresión de *fhuA* (Escolar, Perez-Martin, & de Lorenzo, 1999; McHugh et al., 2003; Troxell & Hassan, 2013).

Las cepas CIM5H y CIM5N presentan la delección de una adenina en posición 391 de FhuA, lo que genera un cambio en el marco de lectura. Delecciones en la secuencia nucleotídica de *fhuA* a partir de este residuo han demostrado disminuir o abolir la estimulación del crecimiento mediada por ferricromo, así como también la afinidad por los fagos T1, T5 ϕ 80 y colicina M (Carmel & Coulton, 1991). En CIM8C y CIM8M, *fhuA* presenta una inserción de cuatro nucleótidos en posición 197. Se ha determinado que cambios en la secuencia nucleotídica a partir de esta posición afectan la actividad transportadora de esta proteína (Endriss, Braun, Killmann, & Braun, 2003; Endriss & Braun, 2004).

4.2.3.1.4 ATP sintasa. El operón *atp* está formado por nueve genes, *atpIBEFHAGDC*, y codifica para el complejo F₁-F₀ ATP sintasa con actividad de translocación de protones (Nielsen, Hansen, Hoppe, Friedl, & von Meyenburg, 1981; Walker, Saraste, & Gay, 1984). Esta enzima, esta formada por dos unidades, F₁ y F₀, de las cuales la primera constituye la unidad catalítica y la segunda constituye el canal de protones. La unidad F₁ cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico mediada por la FPM generada durante la respiración celular, mientras que cataliza la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato inorgánico, junto con la liberación de protones, durante procesos fermentativos. La unidad F₀ esta formada por tres subunidades denominadas a, b y c, codificadas por *atpB*, *atpF* y *atpE*, respectivamente. La unidad catalítica F₁, compuesta por las subunidades α , β , γ , δ y ϵ , es codificada por los genes *atpA*, *atpD*, *atpG*, *atpH* y *atpC*, respectivamente, y solo presenta actividad ATP sintasa cuando se encuentra asociada a la porción F₀ inserta en la membrana celular interna. Mutaciones que modifican *atpG* han demostrado generar un fenotipo bacteriano resistente a antibióticos del tipo aminoglicósidos, ya que defectos en la subunidad γ de F₁ generan una *fuga* de protones desde el interior de la célula, con la consecuente disminución del potencial de membrana (Humbert & Altendorf, 1989). Debido a que la segunda fase de ingreso de aminoglicósidos a la célula se encuentra mediada por el potencial de membrana generado mediante la cadena transportadora de electrones, la *fuga* de protones producida por cambios en el marco de lectura *atpG* disminuiría la entrada de estos antibióticos a la célula, aumentando su resistencia. En este contexto, las mutaciones en *atpG* presentes en CIM8C y CIM8M se relacionarían con el fenotipo bacteriano de resistencia a gentamicina que presentan estas cepas. Las cepas CIM5H y CIM5N presentan mutaciones en genes pertenecientes tanto a las estructuras F₁ y F₀. Las mutaciones observadas en estas cepas no han sido previamente asociadas con un cambio en la actividad de las proteínas, sin embargo, para el caso de la subunidad *a* de F₀ codificada por *atpB*, sustituciones aminoácidas cercanas a esta posición se han asociado con la disminución de su función (Cain & Simoni, 1989). La modificación en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α de F₁ presente en la cepa CIM5H y CIM5N se localiza en el residuo 358, que, si bien no es conservado, se encuentra inserto en una región altamente conservada donde mutaciones puntuales han demostrado afectar la actividad de la proteína (W. Li, Brudecki, Senior, & Ahmad, 2009).

4.2.3.1.5 Transportador de espermidina. Otro de los operones afectados en las cepas derivadas de MG1655 es el operón *potABCD*. PotABCD es un transportador de poliaminas, preferente para espermidina, dependiente de ATP (Igarashi & Kashiwagi, 1999). Este transportador cuenta con una proteína ATPasa (PotA), dos dominios transmembranales (PotB y PotC) y la proteína periplásmica de unión al sustrato (PotD) (Igarashi & Kashiwagi, 1996). Las poliaminas son moléculas policatiónicas presentes en todas las células, ya sean procariotas o eucariotas, e interfieren en una gran variedad de procesos celulares (Figura 11). Entre sus funciones en la célula bacteriana se encuentran la estabilización de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA (Cohen & Lichtenstein, 1960), y la estimulación del crecimiento bacteriano (Bitonti, McCann, & Sjoerdsma, 1982). Por otra parte, se ha establecido el rol de estas poliaminas en la regulación de la expresión génica a nivel traduccional. Según se ha descrito, moléculas del tipo poliaminas favorecen la traducción de proteínas que presentan secuencias Shine-Dalgarno atípicas, favoreciendo la síntesis proteica. Debido a estas secuencias atípicas, en ausencia de poliaminas la traducción de estos genes disminuye considerablemente (Yoshida et al., 2004). Entre los genes cuya traducción es regulada por poliaminas se encuentra *oppA* que codifica para un transportador periplasmático de oligopéptidos, *rpoS*, *cya*, *fis* y *fecI*. RpoS o factor sigma-38, es un regulador transcripcional cuya actividad se encuentra regulada por diferentes estímulos ambientales. La expresión de *rpoS* ocurre a partir de la fase exponencial tardía, siendo el principal regulador transcripcional durante la fase estacionaria. Cya (adenilato ciclasa) está involucrada en la regulación transcripcional de diversos genes, entre los que se encuentran genes relacionados a la producción de energía como *malP*, *malQ*, *man*, *manY*, *manZ*, y genes del metabolismo de nucleótidos como *cdd* y *udp*. Otro de los reguladores transcripcionales regulado por poliaminas es Fis, el cual regula la transcripción de genes relacionados con diferentes procesos celulares como la biosíntesis y el metabolismo de aminoácidos, catabolismo de compuestos orgánicos, estructura celular y respuesta a estrés, entre otros (Bradley, Beach, de Koning, Pratt, & Osuna, 2007). *fecI* codifica para el factor sigma FecI, el cual regula la transcripción de genes involucrados en el transporte de hierro (*fecABCDE*) (Pressler, Staudenmaier, Zimmermann, & Braun, 1988). Debido al efecto de las poliaminas sobre estos reguladores transcripcionales, estos compuestos presentan también un efecto indirecto sobre la expresión de los genes regulados por estas proteínas, aumentando con esto el efecto de las poliaminas sobre la célula bacteriana. Entre los efectos de estos compuestos está la protección de la célula sobre el estrés oxidativo. En este contexto, las poliaminas actúan tanto como neutralizadores de radicales libres en condiciones de estrés leve, así como también como inductores de la expresión del regulón *soxRS*, el cual protege a la célula contra el estrés oxidativo (A. Tkachenko, Nesterova, & Pshenichnov, 2001; A. G. Tkachenko, Akhova, Shumkov, & Nesterova, 2012; A. G. Tkachenko & Fedotova, 2007; A. G. Tkachenko & Nesterova, 2001; A. G. Tkachenko, Pshenichnov, & Nesterova, 2001). Las poliaminas también se relacionan con la resistencia bacteriana a ácidos, específicamente, mediante la modulación del sistema dependiente de la enzima glutamato descarboxilasa a través de la inducción de la traducción de RpoS y la consecuente inducción en la transcripción de *gadE* (Chattopadhyay, Keembiyehetty, Chen, & Tabor, 2015; Chattopadhyay & Tabor, 2013). Otro de los procesos regulados por poliaminas es la formación de biofilm, donde estas poliaminas han demostrado la capacidad de estimular su formación en patógenos como

[illegible]

Las cepas derivadas de MG1655 presentan mutaciones en los genes *potA* (CIM8C y CIM8M), *potB* (CIM5H) y *potC* (CIM5H y CIM5N). Mutaciones puntuales en *potA* se han relacionado con la disminución y pérdida de la actividad ATPasa de esta proteína (Kashiwagi, Innami, Zenda, Tomitori, & Igarashi, 2002; Kashiwagi, Miyamoto, Nukui, Kobayashi, & Igarashi, 1993). Las cepas CIM8C y CIM8M presentan la sustitución del aminoácido glutamina del residuo 208 por

leucina. Q208 se encuentra en la región amino terminal de la proteína (residuos 1-250), la cual esta involucrada tanto en la actividad ATPasa como en la interacción con PotB (Kashiwagi et al., 2002). Si bien la mutación en el residuo 208 no se ha descrito anteriormente, éste es un residuo conservado dentro de PotA y de otras ATPasas, por lo que la sustitución Q208L podría provocar una disminución de la actividad enzimática. Por su parte, la mutación en *potB* presente en CIM5H produce la introducción de un codón de término en el residuo 58, lo que genera una proteína disfuncional. Debido a que las cuatro subunidades son necesarias para el transporte de espermidina al interior de la célula (Igarashi & Kashiwagi, 1999; Kashiwagi et al., 1993), esta mutación afectaría la actividad del transportador. Las cepas CIM5H y CIM5N presentan la sustitución A187L en PotC. El residuo 187 de esta proteína se encuentra en la región transmembranal de la misma. En la actualidad se han identificado mutaciones que alteran la afinidad de esta proteína por la espermidina, sin embargo, estas se encuentran en la región citoplasmática o en la región periplasmática y no se han identificado mutaciones en la región transmembranal que afecten la entrada de espermidina a la célula (Higashi et al., 2010).

4.2.3.1.5 RpoB. Las cuatro cepas seleccionadas presentan una mutación en el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA-polimerasa. Se ha establecido que mutaciones en *rpoB* generan resistencia a rifampicina (B. P. Goldstein, 2014). Todas las cepas presentan una sustitución en la posición 526 de RpoB, donde el residuo de histidina ha sido sustituido por una tirosina (Tabla 13). La histidina en posición 526 de la subunidad β de la RNA-polimerasa es un residuo altamente conservado entre diferentes especies (Sweetser, Nonet, & Young, 1987), y mutaciones en esta posición, incluyendo la sustitución H526Y, se han asociado a la resistencia a rifampicina en *E. coli* y *M. tuberculosis* (Cavusoglu, Turhan, Akinci, & Soyler, 2006; Jin & Gross, 1988; Ma et al., 2006; Paluch-Oles, Koziol-Montewka, & Magrys, 2009).

4.3 $\Delta dnaQ$

4.3.1 Caracterización fenotípica de colonias aisladas desde proceso de evolución

La cepa $\Delta dnaQ$ se evolucionó en presencia de gentamicina bajo las mismas condiciones establecidas para la cepa MG1655. A partir de los cultivos bacterianos finales de esta evolución se aislaron treinta y ocho cepas resistentes a gentamicina (Tabla 13). De cuatro replicas experimentales, tres de ellas presentaron crecimiento tras alcanzar la concentración mínima inhibitoria de gentamicina.

**Nomenclatura de las cepas aisladas derivadas de *ΔdnaQ*
resistentes a Gentamicina**

CIQ1B	CIQ1P	CIQ2N
CIQ1C	CIQ1Q	CIQ2O
CIQ1D	CIQ1R	CIQ2P
CIQ1E	CIQ1S	CIQ2R
CIQ1F	CIQ1T	CIQ2S
CIQ1G	CIQ2B	CIQ4B
CIQ1H	CIQ2C	CIQ4C
CIQ1I	CIQ2D	CIQ4J
CIQ1J	CIQ2E	CIQ4O
CIQ1K	CIQ2G	CIQ4P
CIQ1L	CIQ2H	CIQ4Q
CIQ1M	CIQ2I	CIQ4S
CIQ1O	CIQ2J	

Tabla 13. Cepas de derivadas *ΔdnaQ* resistentes a gentamicina. Cepas aisladas desde cultivos finales en quimiostato en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (256 µg/ml). La nomenclatura de las cepas se basa en quien aisló las cepas (CI), su cepa ancestral *ΔdnaQ* (Q), la replica a partir de la cual se aislaron (Nº), y finalmente la colonia aislada (Letra).

4.3.1.1 Sensibilidad a antimicrobianos

Con el fin de determinar si las cepas aisladas sólo presentaban resistencia a gentamicina, se evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias de antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias (ANEXO I, Tabla A4).

Los resultados obtenidos indican que las cepas aisladas presentan en su totalidad una CMI de gentamicina igual o superior a 512 µg/ml. Así mismo, fue posible observar que todas ellas presentan también resistencia a fosfomicina, con una CMI igual o mayor que 8 µg/ml. La sensibilidad a bromuro de etidio no presentó variaciones en las cepas aisladas respecto al ancestro, a excepción de CIQ1G que presentó mayor resistencia (Tabla 15). Las cepas CIQ1L y CIQ4J incrementaron su resistencia a colistina y rifampicina, respectivamente (Tabla 15). Es posible observar también que al menos el 20% de las cepas aisladas incrementaron su sensibilidad a cloranfenicol, tetraciclina o trimetoprim (Tabla 14).

Antimicrobiano	% de cepas incrementaron resistencia (n=38)	% cepas incrementaron sensibilidad (n=38)
GEN	100	0
AMP	0	2,6
CMF	0	21
COL	2,6	0
CIP	0	0
FOS	100	0
TET	0	36,8
RIF	2,6	13,2
TRI	0	23,7
BEt	2,6	0

Tabla 14. Variación de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$. Porcentaje de cepas que presentan variación en sus concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes antimicrobianos respecto a la cepa ancestral $\Delta dnaQ$. Se consideró variación, toda CMI que presentara más de dos diluciones de diferencia respecto a la cepa ancestral. Los antibacterianos evaluados fueron: gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI), y bromuro de etidio (BEt).

Cepa aislada	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)									
	GEN	AMP	CMF	COL	CIP	FOS	TET	RIF	TRI	BET
<i>ΔdnaQ</i>	0,25	32	4	1	0,016	1	2	4	0,5	32
CIQ1C	512	64	1	2	0,008	≥8	0,125	8	0,25	64
CIQ1D	512	64	1	2	0,008	≥8	0,125	4	0,25	16
CIQ1E	1024	64	0,25	2	0,008	≥8	0,125	4	0,25	32
CIQ1F	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	4	0,5	64
CIQ1G	1024	16	0,25	2	0,008	≥8	0,5	≤1	0,063	512
CIQ1H	1024	8	1	2	0,008	≥8	0,5	≤1	0,063	32
CIQ1J	1024	32	0,25	2	0,008	≥8	0,5	4	0,063	64
CIQ1K	512	32	0,25	2	0,008	≥8	1	4	0,063	64
CIQ1L	512	64	1	16	0,008	≥8	0,125	4	0,063	64
CIQ1M	256	64	1	2	0,008	≥8	0,125	8	0,063	32
CIQ1O	512	64	2	2	0,008	≥8	1	2	0,063	64
CIQ1Q	1024	8	1	1	0,008	≥8	0,5	1	0,063	32
CIQ1R	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	4	0,25	128
CIQ1S	512	64	0,25	2	0,008	≥8	1	4	0,063	8
CIQ1T	512	32	0,25	2	0,008	≥8	0,125	≤1	0,25	64
CIQ2B	512	64	0,25	2	0,008	≥8	0,125	≤1	0,25	64
CIQ2J	512	128	1	1	0,008	≥8	0,5	2	0,5	64
CIQ4B	512	32	2	2	0,008	≥8	0,063	4	0,5	64
CIQ4C	512	32	4	2	0,008	≥8	0,25	8	0,5	64
CIQ4J	512	64	2	2	0,008	≥8	1	32	1	64

Tabla 15. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de *ΔdnaQ* seleccionadas. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BET), que presentan mayor diferencia tanto entre el total de cepas resistentes como respecto a su ancestro.

4.3.1.2 Hemólisis

El análisis de la actividad hemolítica indica que las células aisladas resistentes a gentamicina presentan un cambio en el patrón de hemólisis respecto a su ancestro. De las treinta y ocho cepas aisladas, veintiuna perdieron su capacidad beta-hemolítica, presentando actividad alfa-hemolítica y, sólo en el caso de la cepa CIQ1M, la capacidad hemolítica se perdió por completo (Tabla 16).

Cepa	Hemolisis			Cepa	Hemolisis		
	alfa	beta	Ausencia		alfa	beta	Ausencia
<i>ΔdnaQ</i>	-	+	-	CIQ2C	-	+	-
CIQ1B	+	-	-	CIQ2D	+	-	-
CIQ1C	+	-	-	CIQ2E	+	-	-
CIQ1D	-	+	-	CIQ2G	+	-	-
CIQ1E	+	-	-	CIQ2H	+	-	-
CIQ1F	-	+	-	CIQ2I		-	-
CIQ1G	+	-	-	CIQ2J	+	-	-
CIQ1H	+	-	-	CIQ2N	+	-	-
CIQ1I	+	-	-	CIQ2O	+	-	-
CIQ1J	+	-	-	CIQ2P	+	-	-
CIQ1K	-	+	-	CIQ2R	+	-	-
CIQ1L	+	-	-	CIQ2S	+	-	-
CIQ1M	-	-	+	CIQ4B	+	-	-
CIQ1O	-	+	-	CIQ4C	+	-	-
CIQ1P	-	+	-	CIQ4J	+	-	-
CIQ1Q	+	-	-	CIQ4O	+	-	-
CIQ1R	+	-	-	CIQ4P	-	+	-
CIQ1S	-	+	-	CIQ4Q	+	-	-
CIQ1T	+	-	-	CIQ4S	+	-	-
CIQ2B	+	-	-				

Tabla 16. Perfil de hemólisis de las cepas derivadas de *ΔdnaQ*. Capacidad hemolítica evaluada mediante cultivo en agar Columbia 5% sangre de cordero.

4.3.1.3 Formación de biofilm

Los resultados del análisis de formación de biofilm de las cepas derivadas de *ΔdnaQ* en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración subinhibitoria de 64 µg/ml, muestran que las cepas derivadas de *ΔdnaQ* presentan, en su mayoría, un ratio de formación de biofilm respecto a su ancestro mayor a 1, lo cual indica una mayor capacidad de formar biofilm (Figura 12).

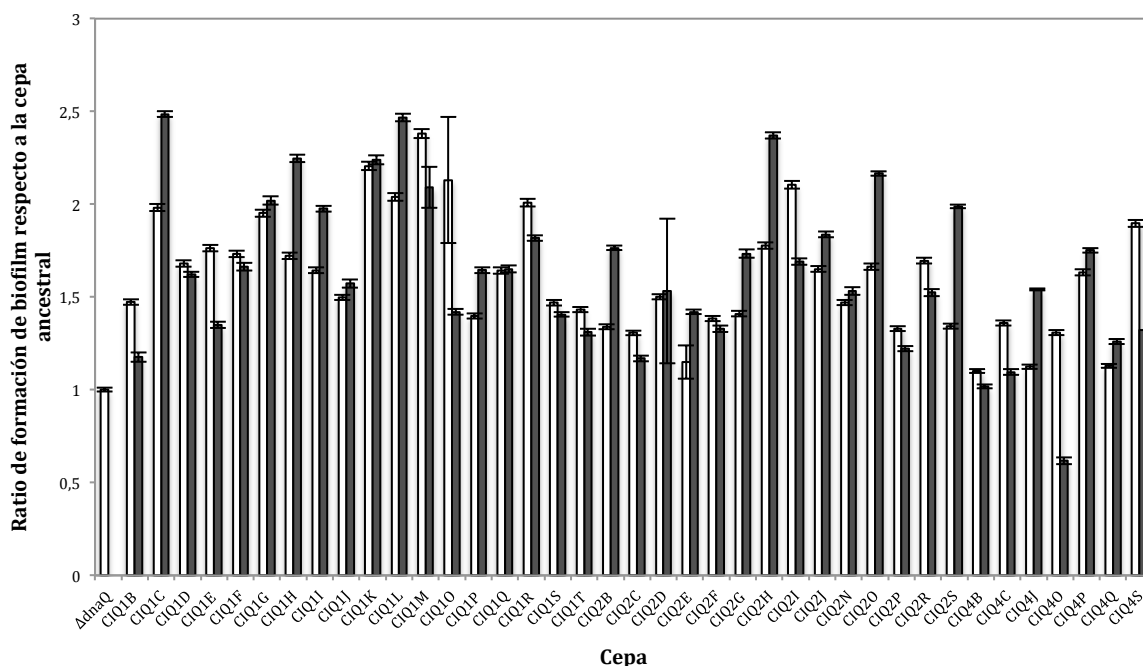


Figura 12. Formación del biofilm de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$. Formación de biofilm respecto a la cepa ancestral $\Delta dnaQ$ en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (\square), y en medio mínimo M9 glucosa suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración final de 64 $\mu\text{g/ml}$ (\blacksquare).

El 55% de las cepas aisladas incrementó la formación de biofilm en al menos un 50% en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, respecto a la cepa ancestral. El incremento en la formación de biofilm de las cepas evaluadas no se relaciona necesariamente con la presencia de antibiótico en el medio, ya que solamente las cepas CIQ1B, CIQ1H, CIQ1L, CIQ2B, CIQ2H, CIQ2O y CIQ2S presentaron un mayor aumento en la formación de biofilm en presencia de gentamicina.

Una vez caracterizadas las cepas resistentes a gentamicina, se seleccionaron cuatro fenotipos diferentes basados en su sensibilidad a antimicrobianos, capacidad hemolítica y formación de biofilm para su posterior análisis. Las cepas seleccionadas fueron: CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J. Estas cepas presentan diferentes características fenotípicas entre sí, a su vez que representan los diferentes fenotipos aislados a partir del ensayo de evolución. CIQ1E se seleccionó debido a su aumento en la sensibilidad a cloranfenicol y tetraciclina. CIQ1G presenta un aumento en la resistencia a bromuro de etidio, mientras que CIQ2J presenta únicamente resistencia a gentamicina. Por último se seleccionó la cepa CIQ4J debido a su aumento en la CMI de rifampicina respecto a su ancestro.

4.3.2 Caracterización fenotípica de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina seleccionadas: CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J.

4.3.2.1 Frecuencia de mutantes

Debido a que el ancestro de esta evolución presenta una delección en el gen *dnaQ*, su frecuencia de mutación es superior a la cepa silvestre en tres órdenes de magnitud. Para analizar si la adaptación y resistencia a gentamicina afectó el fenotipo hipermutador de las células, se llevó a cabo un ensayo de frecuencia de mutantes en placas de agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa y rifampicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, a la cual son sensibles tanto el ancestro como sus cepas derivadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas evolucionadas no modificaron su fenotipo hipermutador (Figura 13). Es posible observar también que la cepa CIQ4J presenta un aumento en la frecuencia de mutantes respecto a su ancestro equivalente a un orden de magnitud.

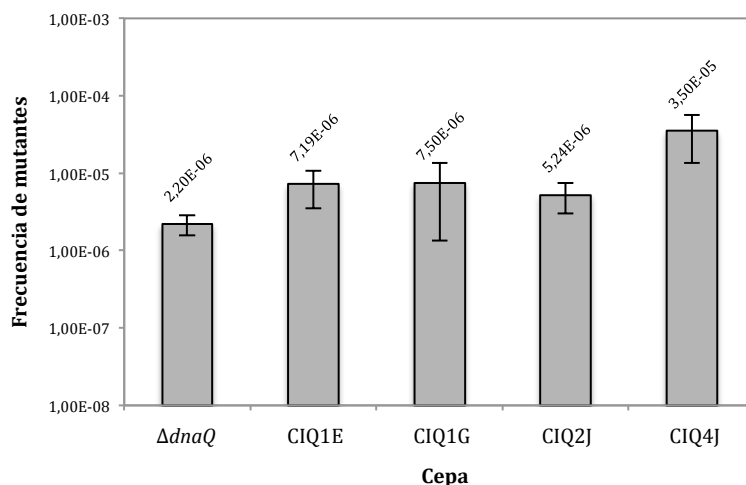


Figura 13. Frecuencia de mutantes para resistencia a rifampicina de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. La frecuencia de mutación de las cepas resistentes a gentamicina se determinó en agar medio mínimo M9 suplementado con rifampicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2.2 Sensibilidad a peróxido de hidrógeno

La sensibilidad de las cepas seleccionadas a peróxido de hidrógeno se determinó mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en agar medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Para esto se evaluaron, de manera independiente, células procedentes de cultivos en fase exponencial y desde fase estacionaria. Los cultivos en fase estacionaria presentaron un mayor halo de inhibición respecto al ancestro, siendo CIQ1E y CIQ1G las cepas con mayor sensibilidad a peróxido de hidrógeno. Por su parte, los halos de

inhibición de las cepas inoculadas desde cultivos en fase exponencial no presentaron variaciones respecto a la cepa ancestral, a excepción de CIQ1G (Figura 14).

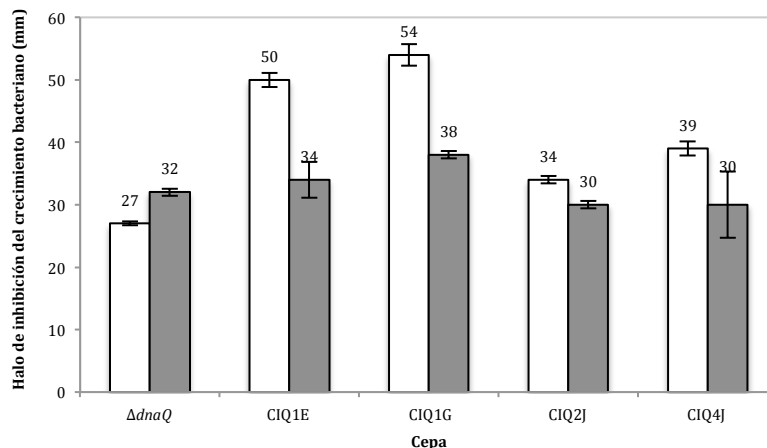


Figura 14. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. El halo de inhibición del crecimiento bacteriano se evaluó en presencia de 26 μ moles de peróxido de hidrógeno en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Este ensayo se realizó utilizando, de manera independiente, inóculos provenientes de cultivos en fase estacionaria (□) e inóculos provenientes desde cultivos bacterianos en fase exponencial (■). Las barras de error representan la desviación estándar entre tres réplicas independientes.

4.3.2.3 Perfil metabólico

Las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ presentan cambios en la capacidad de metabolizar distintos compuestos orgánicos respecto a su ancestro. Esta capacidad metabólica se evaluó utilizando el sistema GN2 de Biolog, y las mayores diferencias se observaron en las cepas CIQ1G y CIQ4J (Figura 15). Todas las cepas evolucionadas mantuvieron la capacidad de metabolizar N-Acetil-D-Glucosamina, α -D-Glucosa, D-manitol, D-manosa y D-trealosa (Anexo I, Tabla A5). La mayor disminución se observa en la capacidad para metabolizar ácidos orgánicos, aminoácidos y nucleósidos, donde el 75% de las cepas presenta una capacidad de metabolizar compuestos orgánicos inferior al 15% respecto a su ancestro (Tabla 17).

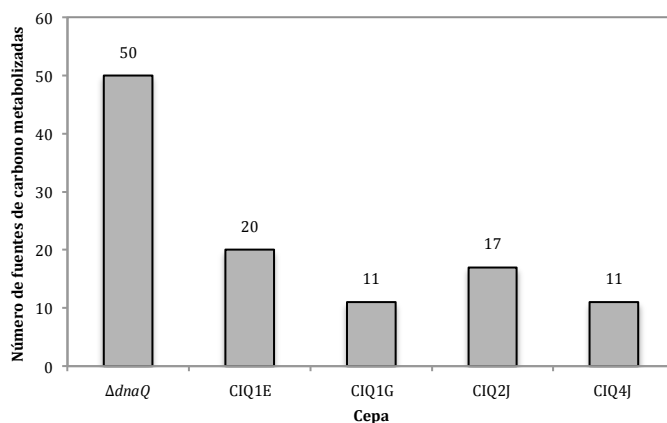


Figura 15. Metabolización de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Variación en el número total de compuestos orgánicos metabolizados por la cepas aisladas y la cepa ancestral $\Delta dnaQ$. El perfil metabólico de las cepas se llevó a cabo mediante el sistema de microplacas Biolog GN2.

Cepa	Número total de compuestos metabolizados					
	Azúcares	Ácidos orgánicos y sus derivados	Aminoácidos y derivados	Nucleósidos	Alcohol	Fosfatos
$\Delta dnaQ$	19	14	10	3	1	3
CIQ1E	15	1	0	3	1	0
CIQ1G	7	1	0	0	1	2
CIQ2J	9	2	1	0	1	2
CIQ4J	8	2	1	0	0	1

Tabla 17. Capacidad metabólica de compuestos orgánicos de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Metabolización de compuestos orgánicos pertenecientes a diferentes familias respecto a la cepa ancestral $\Delta dnaQ$.

4.3.2.4 Perfil Enzimático

La determinación del perfil enzimático de las cepas aisladas se llevó a cabo utilizando el sistema API20E de Biomerieux. Los resultados obtenidos (Anexo I, Tabla 3) indican que las cepas seleccionadas presentan actividad beta-galactosidasa, lisina descarboxilasa, y desaminasa, así como también la capacidad de producir indol, al igual que su ancestro. La capacidad de oxidación o fermentación de glucosa, desorbitol y arabinosa no presenta variaciones respecto a la cepa $\Delta dnaQ$. La cepa CIQ1E ha perdido la capacidad de oxidar/fermentar arabinosa, manitol y melibiosa. Por su parte, la cepa CIQ2J ha perdido la capacidad de oxidación o fermentación de melibiosa, y presenta actividad gelatinasa, lo cual la diferencia de la cepa ancestral.

4.3.2.5 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano, evaluado mediante las curvas de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, y medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (64 $\mu\text{g/ml}$), permitió establecer que las cuatro cepas presentan un mayor tiempo de duplicación que su ancestro en ambas condiciones (Tabla 18). A su vez, se observa que éstas presentan un aumento en su fase *lag* (Figura 16). A excepción de CIQ1G, las cepas seleccionadas ven disminuida su velocidad de duplicación en presencia del antibiótico gentamicina respecto al medio mínimo M9 suplementado únicamente con glucosa (Tabla 18).

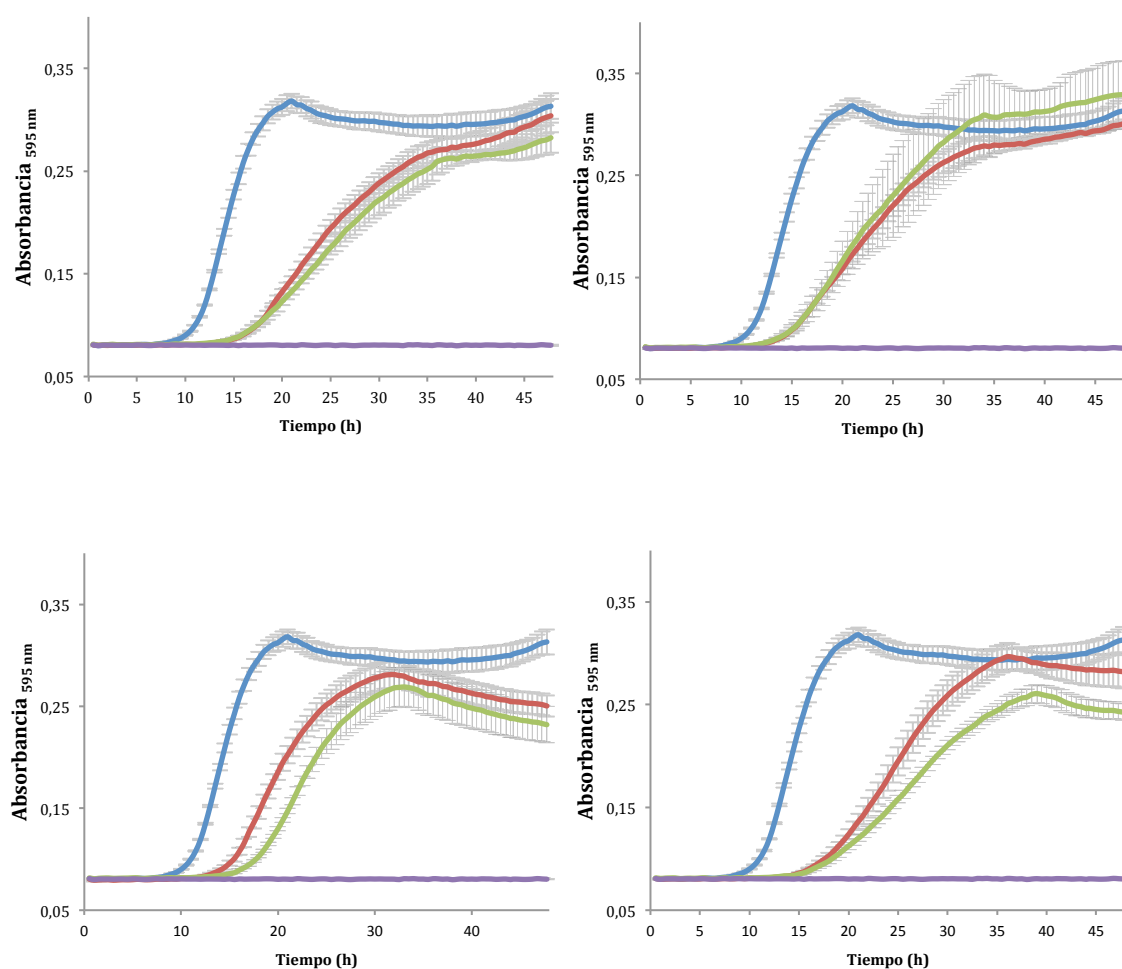


Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Curvas de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (—), y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina a una concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$ (—). A: CIQ1E; B: CIQ1G; C: CIQ2J y D: CIQ4J. Como control se utilizó la cepa $\Delta dnaQ$ en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (—), y en medio mínimo suplementado con glucosa y gentamicina (64 $\mu\text{g/ml}$) (—). Las barras de error representan la desviación estándar entre tres replicas independientes.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)	
	Sin gentamicina	Gentamicina 64 µg/ml
$\Delta dnaQ$	180	s/c
CIQ1E	369	536
CIQ1G	389	386
CIQ2J	278	341
CIQ4J	439	611

Tabla 18. Tiempos de duplicación de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Tiempo de duplicación de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (64 µg/ml), mediante la utilización del programa informático GrowthRates. s/c: sin crecimiento.

4.3.2.7 Morfología celular

Los cambios en la morfología celular de las cepas resistentes a gentamicina se evaluaron mediante microscopía de contraste de fases en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en presencia y ausencia de gentamicina (Figura 17). Para las cepas resistentes, la concentración de gentamicina utilizada fue de 64 µg/ml, mientras que para $\Delta dnaQ$ fue de 0,03 µg/ml. En las imágenes es posible observar una ligera filamentación de las células, tanto del ancestro como de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$, lo cual se relaciona directamente con la delección de este gen, ya que se ha determinado que ésta provoca una inducción del sistema SOS (O'Reilly & Kreuzer, 2004).

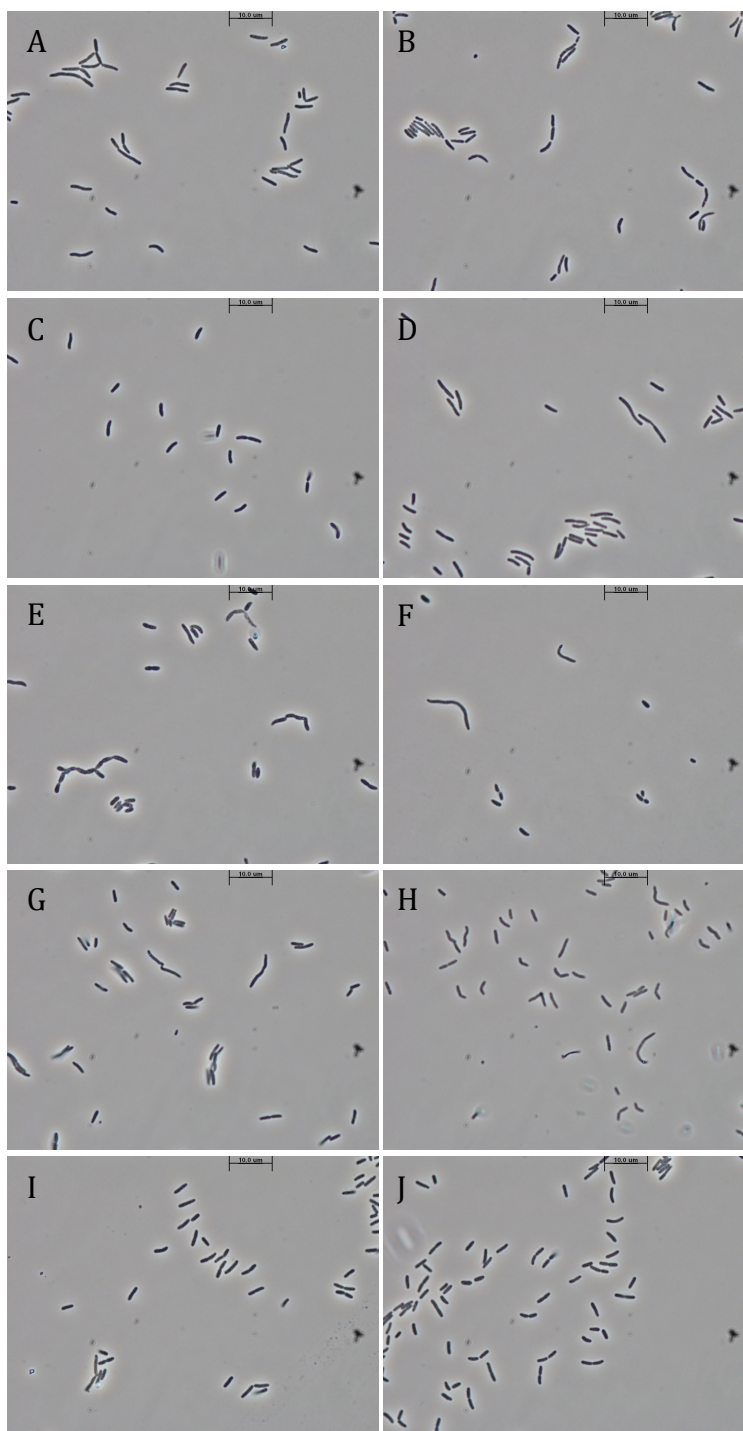


Figura 17. Morfología celular de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. La morfología celular se evaluó mediante microscopía de contraste de fases de cultivo en fase exponencial en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en presencia y ausencia de gentamicina. **A:** $\Delta dnaQ$, sin gentamicina. **B:** $\Delta dnaQ$, gentamicina 0,03 µg/ml. **C:** CIQ1E, sin gentamicina. **D:** CIQ1E, gentamicina 64 µg/ml. **E:** CIQ1G, sin gentamicina. **F:** CIQ1G, gentamicina 64 µg/ml. **G:** CIQ2J, sin gentamicina. **H:** CIQ2J, gentamicina 64 µg/ml. **I:** CIQ4J, sin gentamicina. **J:** CIQ4J, gentamicina 64 µg/ml.

4.3.3 Caracterización genotípica de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina seleccionadas: CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J.

Con la finalidad de determinar los cambios genómicos que sustentan el fenotipo de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina, se secuenció el genoma completo de las cepas CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J, al igual que su ancestro (Anexo II). Las secuencias obtenidas se analizaron tanto respecto a la secuencia publicada de MG1655 como también respecto a la secuencia de su ancestro $\Delta dnaQ$, para determinar las mutaciones no sinónimas presentes únicamente en las cepas resistentes a gentamicina (Anexo II). Los resultados indican que las cepas CIQ1E y CIQ1G tienen un mayor número de mutaciones en comparación a CIQ2J y CIQ4J (Tabla 19). Para las cepas $\Delta dnaQ$, CIQ1E y CIQ1G, alrededor del 50% de las mutaciones presentes en su genoma corresponden a mutaciones no sinónimas, mientras que para CIQ2J y CIQ4J, éstas corresponden a un 42% y 64%, respectivamente. El alto número de mutaciones obtenidas en todas las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ se correlaciona con el fenotipo hipermutador de estas células, corroborado previamente mediante la determinación de la frecuencia de mutantes. Las cepas CIQ1E, CIQ1G y CIQ4G presentan también una mutación puntual en el gen *mutS*, el cual codifica para la proteína MutS, involucrada en el sistema de corrección de emparejamientos erróneos del DNA o MMR (Junop et al., 2003). En las cepas CIQ1E y CIQ1G se observa la sustitución T564P, mientras que en CIQ4J hay una sustitución I695S. Ambas mutaciones se encuentran en la región de unión a ATP de la enzima, sin embargo, el residuo 695, a pesar de ser un residuo parcialmente conservado, se encuentra inserto en una región altamente conservada, por lo que esta mutación podría tener un impacto en la actividad de la proteína (Ginetti, Perego, Albertini, & Galizzi, 1996). Lo anterior se relaciona con los resultados obtenidos mediante la determinación de la frecuencia de mutantes, donde se observa un aumento para la cepa CIQ4J (Figura 13). Las cepas CIQ1E y CIQ1G presentan un discreto aumento en la frecuencia de mutantes, lo cual podría estar relacionado a la posición de la sustitución aminoacídica en MutS.

Cepas	Número Mutaciones Totales	Polimorfismo de nucleótido simple no sinónimo	Mutaciones de alto impacto
$\Delta dnaQ$	97	45	8
CIQ1E	786	330	122
CIQ1G	838	352	148
CIQ2J	276	139	33
CIQ4J	582	253	109

Tabla 19. Mutaciones en cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Resumen del número y tipo de mutaciones presentes en las cepas resistentes a gentamicina derivadas de $\Delta dnaQ$.

Los resultados obtenidos durante la caracterización fenotípica de las cepas CIQ1E y CIQ1G indican un aumento en la sensibilidad a cloranfenicol. Esto ha sido previamente relacionado con el desarrollo de resistencia a aminoglicósidos, posiblemente debido a la alteración en la cadena de transporte de electrones (Lazar et al., 2013). Por otra parte, estas cepas presentan mutaciones en genes cuyas deleciones se han asociado a un aumento en la sensibilidad a este antibiótico (A. Liu et al., 2010); CIQ1E presenta modificaciones en *elaD*, *ppiD*, *tktA* e *yciM*, mientras que CIQ1G presenta modificaciones en *elaD* y *qmcA*.

ElaD es una proteasa con actividad de desubiquitinación, sin embargo, su sustrato fisiológico no ha sido identificado. Ambas cepas presentan un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 38, lo que da origen a una proteína disfuncional (Catic, Misaghi, Korbel, & Ploegh, 2007). PpiD muestra analogía estructural con una proteína chaperona, y su deleción genera una disminución de las proteínas de la membrana externa y afecta el plegamiento en respuesta a estrés (Matern, Barion, & Behrens-Kneip, 2010). La sustitución L101M en CIQ1E se localiza en el dominio periplasmático 1, y mutaciones en esta posición no se han asociado a la pérdida de la actividad (Dartigalongue & Raina, 1998). TktA es una enzima transcetolasa que cataliza la transferencia reversible de un grupo cetol entre diferentes sustratos (Sprenger, Schorken, Sprenger, & Sahm, 1995). Debido a que en CIQ1E esta proteína presenta un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 659, de un total de 663, esta mutación no afecta a los dominios funcionales que han sido descritos para esta enzima. *yciM*, ahora *lapB*, codifica para una proteína con secuencias repetitivas de tetratricopeptido, involucrada en la regulación de la síntesis de lípido A en *E. coli* (Mahalakshmi, Sunayana, SaiSree, & Reddy, 2014). En CIQ1E, LapB presenta la sustitución de una adenina por una timina en el residuo 54. Esta mutación se ubica en el dominio topológico, sin embargo, no se han identificado mutaciones en este residuo, o cercanas a éste, que afecten la actividad de la proteína. Por su parte, la cepa CIQ1G presenta un cambio en el marco de lectura de QmcA a partir del residuo 150. Esta proteína actúa como supresora de la doble mutante *ftsH* y *htpX*, y ambos genes dan origen a enzimas del tipo proteasas (Chiba, Ito, & Akiyama, 2006).

Otro fenotipo observado en la cepa CIQ1E es el aumento en la sensibilidad a tetraciclina, lo cual ha sido previamente relacionado con alteraciones en la membrana externa, particularmente en el LPS. Esta cepa presenta mutaciones en los genes *waaQ*, *ppiD* e *yciM*, y la deleción de éstos ha sido asociada con un aumento en la sensibilidad a tetraciclina (A. Liu et al., 2010). Es posible observar también un aumento en la sensibilidad a trimetoprim en la cepa CIQ1G. Esta cepa presenta un cambio en el marco de lectura de los genes *ddlB* y *qmcA*, ambos relacionados a la síntesis de pared celular, cuya deleción ha sido relacionada al aumento en la sensibilidad de trimetoprim (A. Liu et al., 2010). Las cepas CIQ1G y CIQ4J son más resistentes bromuro de etidio y rifampicina, respectivamente, sin embargo, no ha sido posible establecer la relación entre estos fenotipos y los genotipos de estas cepas. Lo anterior también ocurre en relación a la resistencia a fosfomicina observada en las cuatro cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina. Si bien todas las cepas desarrollaron resistencia a este antibiótico, no se observan mutaciones en los genes previamente descritos como responsables de este fenotipo. Esto plantea la existencia de mutaciones no descritas previamente que producen

dichos fenotipos de resistencia, y que serán analizadas en futuros trabajos en nuestro laboratorio.

Para determinar las posibles mutaciones relacionadas a la resistencia a gentamicina, se establecieron los genes u operones afectados en todas cepas resistentes. Los genes afectados con mutaciones no sinónimas comunes para CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J son *fhuA*, *fusA*, *glf*, *pata* y *sbmA*, y los operones afectados en estas cepas son *atp*, *cyo*, *glg*, *nuo*, *potABCD*, *yey* e *yjh* (Tabla 20).

Cepa	Operón	Gen	Tipo de Mutación	Posición
CIQ1E	<i>sbmA-yaiW</i>	<i>sbmA</i>	Cambio en el marco de lectura	61 (DEL)
	<i>str</i>	<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	F605I
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	480 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoA</i>	Cambio en el marco de lectura	8 (DEL)
		<i>cyoB</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	Y181C
	<i>atp</i>	<i>atpA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	E299V
	<i>potABCD</i>	<i>potA</i>	Cambio en el marco de lectura	117 (DEL)
		<i>potD</i>	Cambio en el marco de lectura	322 (DEL)
	<i>pat</i>	<i>pata</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	K23R
	<i>glf</i>	<i>glf</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	R174K
	<i>yej</i>	<i>yejA</i>	Cambio en el marco de lectura	377 (DEL)
	<i>nuo</i>	<i>nuoG</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	D594V
CIQ1G	<i>glg</i>	<i>glgX</i>	Cambio en el marco de lectura	11 (DEL)
	<i>yjhBC</i>	<i>yjhB</i>	Cambio en el marco de lectura	300 (DEL)
	<i>sbmA-yaiW</i>	<i>sbmA</i>	Cambio en el marco de lectura	61 (DEL)
	<i>str</i>	<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	F605I
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	480 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoA</i>	Cambio en el marco de lectura	8 (DEL)
		<i>cyoB</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	K4R
	<i>atp</i>	<i>atpA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	E299V
	<i>potABCD</i>	<i>potA</i>	Cambio en el marco de lectura	117 (DEL)
		<i>potD</i>	Cambio en el marco de lectura	63 (DEL)
		<i>potD</i>	Cambio en el marco de lectura	322 (DEL)
		<i>potD</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	D111E
	<i>pat</i>	<i>pata</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	K23R
	<i>glf</i>	<i>glf</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	R174K
	<i>yej</i>	<i>yejA</i>	Cambio en el marco de lectura	377 (DEL)
	<i>nuo</i>	<i>nuoC</i>	Cambio en el marco de lectura	28 (INS)
	<i>glg</i>	<i>glgX</i>	Cambio en el marco de lectura	11 (DEL)
	<i>yjhBC</i>	<i>yjhB</i>	Cambio en el marco de lectura	300 (DEL)
		<i>yjhB</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	Y364C
CIQ2J	<i>sbmA-yaiW</i>	<i>sbmA</i>	Ganancia de codón de término	3 (TERM)
	<i>str</i>	<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	F605L
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	144 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoB</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	W280L
	<i>atp</i>	<i>atpG</i>	Ganancia de codón de término	259 (TERM)
	<i>potABCD</i>	<i>potD</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	A260P
	<i>pat</i>	<i>pata</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	V57F
	<i>glf</i>	<i>glf</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	D271E
	<i>yej</i>	<i>yejE</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	Y167C
	<i>nuo</i>	<i>nuoH</i>	Cambio en el marco de lectura	274 (DEL)
	<i>glg</i>	<i>glgX</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	F23V
	<i>yjhBC</i>	<i>yjhC</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	I133T
CIQ4J	<i>sbmA-yaiW</i>	<i>sbmA</i>	Cambio en el marco de lectura	308 (DEL)
	<i>str</i>	<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	A608E
	<i>fhu</i>	<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	56 (DEL)
	<i>cyo</i>	<i>cyoA</i>	Cambio en el marco de lectura	8 (DEL)
	<i>atp</i>	<i>atpB</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	Y263C
		<i>atpG</i>	Cambio en el marco de lectura	230 (DEL)
	<i>potABCD</i>	<i>potA</i>	Cambio en el marco de lectura	240 (DEL)
	<i>pat</i>	<i>pata</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	N354D
	<i>glf</i>	<i>glf</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	119 (INS)
	<i>yej</i>	<i>yejE</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	E181G
		<i>yejF</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	I447F
	<i>nuo</i>	<i>nuoL</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	F434Y
	<i>glg</i>	<i>glgA</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	H173Y
	<i>yjhBC</i>	<i>yjhC</i>	Cambio en el marco de lectura	303 (INS)
		<i>yjhC</i>	Polimorfismo de nucléotido simple	A308V

Tabla 20. Mutaciones comunes en las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. Mutaciones en genes y operones comunes para las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ resistentes a gentamicina.

4.3.3.1 Mutaciones comunes

4.3.3.1.1 EF-G. Las cuatro cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ presentan sustituciones aminoacídicas en el dominio V del factor de elongación G (EF-G) codificado por *fusA* (A et al., 1994). Este dominio, junto con el dominio IV, son fundamentales para la actividad de translocación y para el *reciclaje* del ribosoma (Savelsbergh et al., 2000).

4.3.3.1.2 Citocromo *bo₃* oxidasa. Las mutaciones en el operón *cyo* presentes en las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ se localizan en *cyoA* y *cyoB*. Las cepas CIQ1E, CIQ1G y CIQ4J presentan un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 8 de *CyoA*, a causa de la delección de un nucleótido. Debido a que este cambio surge al inicio de la proteína, afectando el sitio de unión de ubiquinol, y a que todas las subunidades de la enzima son necesarias para su funcionamiento, estas mutaciones pueden afectar significativamente la funcionalidad de la proteína. Por su parte, las cepas CIQ1E, CIQ1G y CIQ2J presentan también sustituciones en *CyoB*, la cual presenta el sitio de unión a hierro y cobre de la enzima. En la cepa CIQ1E, *CyoB* presenta la sustitución R174Y. Este residuo se ubica en una región periplasmática, y mutaciones cercanas a esta posición no alteran la actividad de la proteína (Kawasaki, Mogi, & Anraku, 1997). CIQ1G presenta una sustitución en el residuo 4 de la proteína. Éste se localiza en una región periplasmática y, en la actualidad, no se han identificado mutaciones en esta región que afecten su actividad. Por su parte, CIQ2J presenta la sustitución de un triptófano en posición 208 por una leucina. Este residuo se encuentra en una región transmembranal y no se han identificado mutaciones en éste que afecten la actividad enzimática. Debido a la importancia de la fuerza protón motriz y del potencial de membrana en el ingreso de los aminoglicósidos a la célula, las mutaciones que afectan la funcionalidad de esta enzima afectarían la entrada de gentamicina a la célula bacteriana (Ver sección 4.2.3.1.2).

4.3.3.1.3 ATP sintasa. Las cepas CIQ1E y CIQ1G presentan la sustitución E299V en *atpA*, el cual codifica para la subunidad α de la unidad catalítica (F_1) de la ATP sintasa. Esta mutación no afecta al sitio catalítico de la enzima. Los resultados indican que las cepas CIQ2J y CIQ4J presentan mutaciones en *atpG*. En la cepa CIQ4J se observa también una sustitución Y263C en la subunidad a de la unidad F_0 de la enzima ATP sintasa, codificada por *atpB*, la cual forma un canal de protones integrado a la membrana plasmática. La subunidad a es una proteína de membrana fundamental para la translocación de protones, y el residuo 263 se ubica en una región transmembranal, y mutaciones en esta región se han asociado a una disminución de su actividad.

4.3.3.1.4 Transportador de espermidina. En relación al transportador de espermidina codificado por *potABCD*, las cepas CIQ1E, CIQ1G y CIQ2J presentan un cambio en el marco de lectura de *potD*. *PotD* se ubica en el periplasma, siendo su función la unión de espermidina para su transporte al interior de la célula. Debido a que el cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína afecta residuos funcionales (Sugiyama, Matsuo, et al., 1996; Sugiyama, Vassilyev, et al., 1996), las mutaciones en estas cepas afectarían la afinidad de *PotD* por la espermidina. Cambios en el marco de lectura de *potA* fueron identificadas en CIQ1E,

CIQ1G y CIQ4J. Para todos los casos, los cambios en la secuencia proteica afectan dominios funcionales de la proteína, lo que se ha comprobado que afecta su actividad (Kashiwagi, Endo, Kobayashi, Takio, & Igarashi, 1995; Kashiwagi et al., 2002; Kashiwagi et al., 1993).

4.3.3.1.5 PatA. En relación al metabolismo de poliaminas, las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ presentan mutaciones puntuales en el gen *patA*, que codifica para una enzima del tipo putrescina aminotransferasa. Esta enzima es parte de la ruta de degradación de esta poliamina y es altamente inducida en presencia de putrescina (Schneider & Reitzer, 2012). Otros sustratos con menor afinidad a esta enzima son la cadaverina y la espermidina. La sustitución K23R en las cepas CIQ1E y CIQ1G no afecta residuos conservados de la enzima, así como tampoco afecta dominios funcionales de la misma. En las cepas CIQ2J y CIQ4J las sustituciones V57F y N354D, respectivamente, afectan residuos parcialmente conservados. El residuo 354 se ubica contiguo a un residuo totalmente conservado de esta proteína (Cha, Jeong, Rojviriyi, & Kim, 2014), por lo que su modificación podría tener un impacto sobre la funcionalidad de la misma.

4.3.3.1.6 FhuA. En las cuatro cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ se observa un cambio en el marco de lectura del transportador de ferricromo FhuA, codificado por *fhuA*. El cambio en el marco de lectura de esta proteína en las cuatro cepas afecta residuos que han sido identificados como fundamentales para la actividad de este transportador (Endriss et al., 2003).

4.3.3.1.7 SbmA. Un cambio en el marco de lectura de SbmA se observa en las cuatro cepas resistentes. SbmA es un transportador de péptidos que se localiza en la membrana interna, y se ha definido que este transportador es responsable del ingreso de microcina B17 y microcina 25 a la célula (Lavina, Pugsley, & Moreno, 1986; Salomón & Farías, 1995). Mutaciones en esta proteína generan resistencia a péptidos con alto contenido de prolina (Mattiuzzo et al., 2007). Se ha establecido también que SbmA actúa a continuación de FhuA en el transporte de microcina 25 (Salomón & Farías, 1995). Esta proteína actúa en asociación con TonB, utilizando la energía generada a través de la fuerza protón motriz para el transporte de sustratos (Corbalan et al., 2013; Runti et al., 2013). En las cepas CIQ1E y CIQ1G, una delección genera un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 63, mientras que en la cepa CIQ2J la introducción de un codón de termino en el residuo 8 impide la traducción completa de la proteína. En CIQ4J, SbmA presenta un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 308, el cual se encuentra en la región citoplasmática de la proteína.

4.3.3.1.8 Glf. *glf* codifica para la enzima UDP-D- galactopiranos mutasa, la cual cataliza, de manera reversible, la conversión bidireccional entre UDP-galactopiranos y UDP-galactofuranosa (Nassau et al., 1996). Este último compuesto es necesario para la formación del antígeno O en el LPS. La cepa MG1655, al igual que otras cepas derivadas de *E. coli* K-12, carece de antígeno O, debido a la mutación *rfb-50* generada por la inserción de IS5 (Liu and Reeves 1994). De esta manera, las mutaciones en este gen no tienen impacto en el fenotipo bacteriano de las cepas obtenidas a partir del ensayo de evolución. Estas mutaciones podrían

representar una adaptación al crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, por disminución en el gasto energético.

4.3.3.1.9 Transportador de péptidos YejABEF. Entre las modificaciones que se han identificado en las cepas resistentes a gentamicina, en encuentran mutaciones en el transportador de polipéptidos dependiente de ATP YejABEF. Éste pertenece a la familia de transportadores ABC, donde la YejF actúa como ATPasa, mientras que YejE y YejB se ubican en la membrana citoplasmática. YejA actúa como proteína receptora en el periplasma (Saurin, Hofnung, & Dassa, 1999). Mutaciones en este transportador generan resistencia a microcina C (Novikova et al., 2007). La delección de un nucleótido en las cepas CIQ1E y CIQ1G genera un cambio en el marco de lectura de YejA a partir del residuo 377, lo que altera la secuencia de la proteína en más de un 50%. Actualmente, no se han identificado los dominios funcionales de esta proteína, sin embargo, debido a este cambio su actividad podría verse alterada. En las cepas CIQ2J y CIQ4J se observan las sustituciones aminoacídicas Y167C y E181G en YejE, respectivamente. Al igual que YejA, esta proteína se localiza en la región de la membrana plasmática. Ambas sustituciones se localizan en la región conservada de la YejE por lo que podrían modificar su funcionalidad. Por su parte, la cepa CIQ4J presenta también la sustitución I447F en YejF. Esta mutación se encuentra en una de las regiones conservadas de la proteína, lo que podría alterar su actividad ATPasa.

4.3.3.1.10 NDH-I. Otro de los operones que presenta modificaciones tras el proceso de evolución hacia la resistencia a gentamicina de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ es el operón *nuo* que codifica para la el complejo NADH:ubiquinona reductasa I (NDH-I) (Leif, Sled, Ohnishi, Weiss, & Friedrich, 1995). Esta enzima de tipo NADH deshidrogenasa cataliza la transferencia de electrones desde NADH hacia ubiquinona, expulsando protones hacia el periplasma, generando un gradiente electroquímico. Debido a que NDH-I es necesaria durante la respiración anaeróbica, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como último aceptor de electrones, se ha establecido que este complejo puede transferir también electrones desde NADH hacia menaquinona (Tran, Bongaerts, Vlad, & Unden, 1997). Entre los factores que regulan la actividad de NDH-I se encuentran las concentraciones de oxígeno, nitrógeno y fumarato. En la actualidad se han identificado dos reguladores transcripcionales que afectan este operón: Fnr e IHF (Bongaerts, Zoske, Weidner, & Linden, 1995). Este complejo enzimático está formado por tres unidades. La unidad soluble está constituida por NuoE, NuoF y NuoG, y cataliza la oxidación de NADH. Ésta contiene sitios de unión a hierro y sulfato, así como también a Fnr. Las subunidades NuoB, NuoCD y NuoI forman una unidad anfipática que interconecta las unidades solubles e insolubles. La tercera unidad es hidrófoba y está formada por NuoA, NuoH, NuoJ, NuoK, NuoL, NuoM y NuoN. De estas subunidades, NuoJ, NuoK, NuoM y NuoN están involucradas en la generación del gradiente electroquímico (M. Braun, Bungert, & Friedrich, 1998).

CIQ1E presenta la sustitución D594V en NuoG, proteína fundamental para la actividad del complejo que forma parte de la unidad hidrófila. Según lo establecido, este residuo no es parte de un dominio funcional en la proteína. En la cepa CIQ1G se observa un cambio en el marco de

lectura a partir del residuo 28 de la subunidad NuoCD, la cual actuaría como canal de protones. El cambio en el marco de lectura de esta proteína genera modificaciones en los residuos Glu-138, Glu-140, and Asp-143, los cuales son fundamentales tanto para la transducción de energía como para la estabilidad estructural del complejo. Debido a que todas las subunidades son esenciales para el correcto funcionamiento de NDH-I, esta mutación tendría un alto impacto para la célula. Por su parte, en la cepa CIQ2J la delección de un nucleótido genera un cambio en el marco de lectura desde el residuo 274 de NuoH. Esta proteína, localizada en la membrana interna, es parte de la unidad hidrófoba de NDH-I. Los residuos conservados de ésta se han identificado en la región citoplasmática, y su modificación afecta la actividad del complejo. El cambio en la secuencia a partir del aminoácido en posición 274 genera una modificación en el dominio citoplasmático cuatro (C4). La sustitución de residuos altamente conservados en esta región ha sido relacionada con la disminución de su actividad enzimática (Sinha et al., 2009), por lo que este cambio en el marco de lectura afectaría la funcionalidad del complejo. La cepa CIQ4J presenta la sustitución F434Y en NuoL, la cual actuaría como canal de protones, y mutaciones en residuos conservados de esta proteína han demostrado disminuir la actividad del complejo. Si bien el residuo 434 es parcialmente conservado, éste se encuentra próximo al residuo 431 que es altamente conservado. Mutaciones en este último afectan el ensamblaje del complejo enzimático (Nakamaru-Ogiso et al., 2010). Debido al cambio de polaridad en el residuo 434 y la interacción por carga de las subunidades, esta mutación podría afectar la estructura de la proteína, sin embargo, se requieren mayores estudios para su determinación.

A causa de la importancia del gradiente electroquímico y del potencial de membrana para el ingreso de aminoglicósidos a la célula bacteriana, mutaciones en el operón *nuo* que alteren su actividad afectarían el ingreso de estos antibióticos a la célula. En la actualidad se ha identificado que cepas mutantes en este operón presentan menor ingreso de aminoglicósidos a la célula y una mayor resistencia a gentamicina (Ezraty et al., 2013). Mutaciones en *nuoG* han sido identificadas en cepas de *P. aeruginosa* aisladas desde pacientes con fibrosis quística, y se ha establecido que esta mutación produce un aumento en la CMI de amikacina (Islam et al., 2009).

4.3.3.1.11 Metabolismo de glucógeno: GlgA/GlgX. Las cepas resistentes a gentamicina presentan también alteraciones en el metabolismo de glucógeno. CIQ1E, CIQ1G y CIQ2J presentan mutaciones en el gen *glgX*. Éste codifica para una enzima de escisión de glucógeno, y su delección en *E. coli* produce un incremento en la producción de este azúcar (Dauvillée et al., 2005). CIQ1E y CIQ1G presentan un cambio en el marco de lectura de la proteína a partir del residuo 11, por lo que se genera un cambio en la secuencia aminoacídica que comprende todos los dominios funcionales de la misma, mientras que la cepa CIQ2J presenta la sustitución F23V. Este residuo no se encuentra en ningún dominio funcional de la misma. Por su parte, la cepa CIQ4J presenta una mutación en el gen *glgA*. Este gen codifica para la enzima glucógeno sintasa, del tipo glucosil-transferasa. Esta enzima cataliza la adición de un grupo glucosilo proveniente de la ADP-glucosa al extremo no reductor del glucógeno. La sustitución

H173Y presente en la cepa CIQ4J no afecta ningún residuo previamente establecido como funcional en la proteína, por lo que, según lo descrito, no afectaría la actividad enzimática (Yep et al, 2004; Yep et al, 2006). En la actualidad no se ha establecido que mutaciones en estas proteínas se relacionen con la resistencia a gentamicina, por lo que podría tratarse de una adaptación al medio de cultivo.

4.3.3.1.12 YjhBC. Por último, las cepas resistentes a gentamicina presentan mutaciones en el operón YjhBC. Las cepas CIQ1E y CIQ1G presentan un cambio en el marco de lectura a partir del residuo 300 de YjhB. Esta proteína no ha sido caracterizada y, de acuerdo a su homología estructural, podría tratarse de un transportador de ácido siálico o de metabolitos relacionados (Kalivoda, Steenbergen, & Vimr, 2013). Las cepas CIQ2J y CIQ4J presentan mutaciones en YjhC, y se ha establecido que esta proteína podría estar involucrado en el transporte de ácido siálico, sin embargo, la contribución de estas mutaciones a la resistencia a gentamicina o a la adaptación al medio de cultivo desconoce.

4.4 Mutaciones comunes en las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655 y $\Delta dnaQ$

Tras el análisis y la caracterización de las ocho cepas resistentes a gentamicina seleccionadas en este estudio, se determinaron las mutaciones comunes entre éstas. Los resultados indican que estas cepas presentan mutaciones no sinónimas en los genes *fhuA* y *fusA*, y en los operones *atp*, *cyo* y *potABCD*.

Para determinar las trayectorias evolutivas de estos genes, se analizaron muestras obtenidas a partir de distintos tiempos del ensayo de evolución. De esta manera, y mediante la secuenciación de estos genes, fue posible establecer en qué etapa de la evolución se generaron estas mutaciones. En la Tabla 21 es posible observar que las mutaciones en *fusA* se generan en las primeras etapas de la evolución de MG1655 y de $\Delta dnaQ$. Estas mutaciones se aprecian a partir de concentraciones de gentamicina de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, lo que equivale a dos veces la CMI del ancestro. Las mutaciones en los operones *cyo* y *potABCD* se observan a partir de cultivos a concentraciones de gentamicina de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para $\Delta dnaQ$, y 4 $\mu\text{g/ml}$ para MG1655. Mutaciones en *fhuA* se registran en cepas obtenidas a partir de una concentración de gentamicina de 2 $\mu\text{g/ml}$ para el fenotipo hipermutador, mientras que para la cepa silvestre MG1655 éstas se observan a partir de dosis de gentamicina de 8 $\mu\text{g/ml}$. Para ambos fenotipos, las mutaciones en el operón *atp* se observan a partir de la colonias aisladas desde la concentración de gentamicina de 8 $\mu\text{g/ml}$, equivalente a 32 veces la CMI de ambos ancestros (Figura 18).

Gen	Concentración de gentamicina de la muestra (µg/ml)	
	MG1566	Δ dnaQ
<i>atp</i>	8	8
<i>cyo</i>	4	0,5
<i>fhuA</i>	8	2
<i>fusA</i>	0,5	0,5
<i>potABCD</i>	4	0,5

Tabla 21. Trayectorias evolutivas de las cepas derivadas de MG1655 y Δ dnaQ seleccionadas: mutaciones comunes. Determinación de la concentración de gentamicina en el ensayo de evolución a la cual fue posible aislar cepas mutantes para los genes comunes.

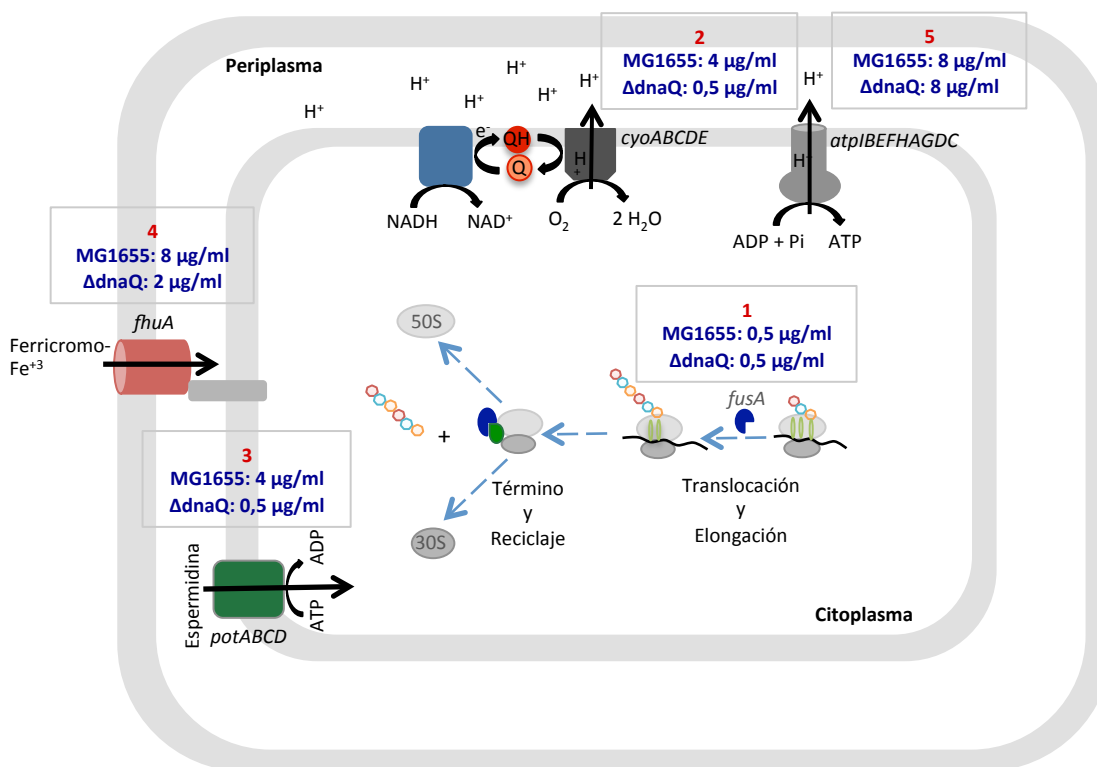


Figura 18. Esquema de las mutaciones comunes en las cepas resistentes a gentamicina y sus trayectorias evolutivas. Representación de las mutaciones comunes en las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655 y Δ dnaQ. La numeración indica el orden en el que se generan estas mutaciones en MG1655, y en cada cuadro se indica la concentración de gentamicina en el proceso de evolución desde donde se aislaron cepas mutantes en estos genes. Para las cepas derivadas de Δ dnaQ, las mutaciones indicadas bajo los números 1, 2 y 3 se identificaron en muestras a la misma concentración de gentamicina.

4.5 CIM8M como modelo de resistencia a gentamicina

Tras la caracterización de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ fue posible establecer que tanto éstas como las cepas resistentes a gentamicina derivadas de MG1655 presentan mutaciones no sinónimas en los genes *fhuA* y *fusA*, y en los operones *atp*, *cyo* y *potABCD*. A partir de esta caracterización se seleccionó la cepa CIM8M como modelo de estudio de la resistencia a gentamicina. Esta cepa tiene una CMI de gentamicina de 512 $\mu\text{g/ml}$ y presenta un menor número de mutaciones en comparación a las otras cepas resistentes. Debido a que las mutaciones en *fusA*, *fhuA* y en los operones *potABCD*, *cyo* y *atp* son comunes a todas las resistentes, se evaluó el efecto de estas mutaciones presentes en CIM8M sobre la resistencia a gentamicina.

Las mutaciones que presenta CIM8M en los genes y operones comunes se observan en la tabla 22.

Gen	Tipo de modificación	Mutación
<i>fusA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	F593L
<i>fhuA</i>	Cambio en el marco de lectura	197 (INS)
<i>cyoA</i>	Ganancia de codón de término	67 (TERM)
<i>atpG</i>	Cambio en el marco de lectura	245 (DEL)
<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	M247T
<i>atpG</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	M247V
<i>potA</i>	Polimorfismo de nucleótido simple	Q208L

Tabla 22. Mutaciones en la cepa CIM8M. Mutaciones en la cepa CIM8M en los genes y operones identificados como comunes para todas las cepas resistentes a gentamicina.

Tanto el factor de elongación G (EF-G) como la subunidad ATPasa del transportador de espermidina (PotA) presentan mutaciones puntuales en su secuencias aminoacídicas (Figura 19), mientras que en los genes *fusA*, *cyoA* y *atpG* se produce un cambio en el marco de lectura, generando cambios significativos en las proteínas. A partir de estos resultados se analizó la contribución de cada una de estas mutaciones en el desarrollo de resistencia a gentamicina.

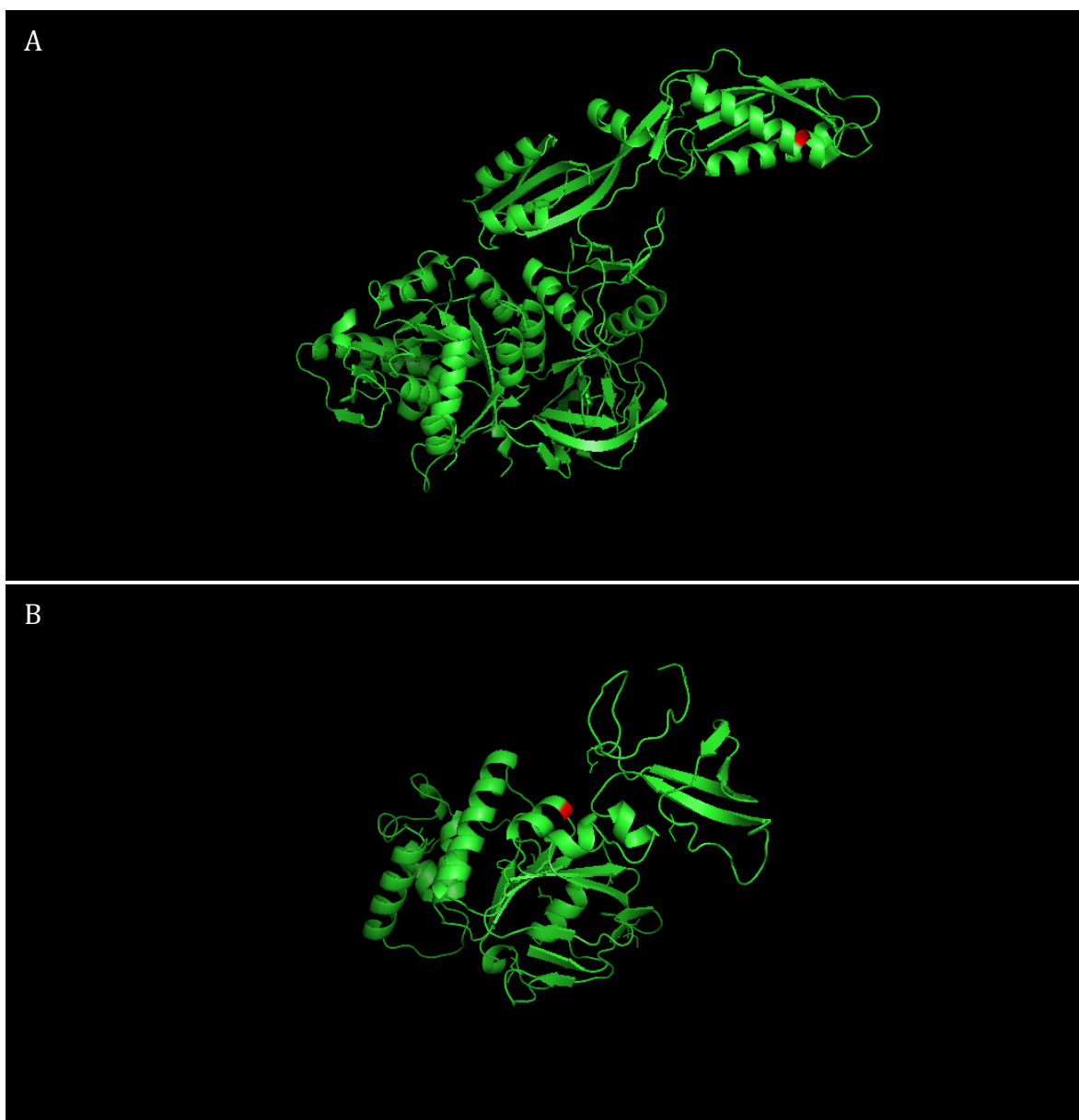


Figura 19. Estructura de las proteínas mutantes en CIM8M. En rojo se indica la posición de la sustitución aminoacídica **A:** EF-G F593L. **B:** PotA Q208L.

4.5.1 Evaluación de la sensibilidad de CIM8M a aminoglicósidos

Para determinar si la resistencia a gentamicina de la cepa CIM8M es específica para este aminoglicósido, o si se trata de un mecanismo común para antibióticos aminoglicósidos, se determinaron las CMI para amikacina y kanamicina.

Los resultados indican que el mecanismo de resistencia a gentamicina es común para otros antibióticos del tipo aminoglicósidos (Tabla 23).

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)		
	GEN	AMK	KAN
MG1655	0,25	2	4
CIM8M	512	≥ 64	≥ 64

Tabla 23. Concentraciones mínimas inhibitorias de aminoglicósidos de CIM8M. Las concentraciones mínimas inhibitorias de aminoglicósidos se determinaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Los antibióticos evaluados fueron gentamicina (GEN), amikacina (AMK) y kanamicina (KAN).

4.5.2 Ensayo de complementación cepa CIM8M

Para evaluar el efecto de las mutaciones comunes que presenta CIM8M sobre la resistencia a gentamicina, esta cepa fue transformada, de manera independiente, con los plásmidos pCA24N, pCA-*atpG*, pCA-*cyoA*, pCA-*fhuA*, pCA-*fusA* y pCA-*potA*, provenientes de la colección ASKA (Kitagawa et al., 2005). Una vez complementada, se evaluó la concentración mínima inhibitoria de gentamicina para cada caso (Tabla 24) y el efecto de estas complementaciones sobre el crecimiento bacteriano (Figura 14). Tanto las CMI de gentamicina como las curvas de crecimiento se evaluaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol, en presencia y ausencia de gentamicina. Los resultados muestran una disminución de la CMI de gentamicina de todas las cepas complementadas, a excepción de CIM8M pCA-*cyoA*, para la cual no se observan diferencias respecto al control.

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)
CIM8M pCA24N	512
CIM8M pCA- <i>atpG</i>	128
CIM8M pCA- <i>cyoA</i>	512
CIM8M pCA- <i>fhuA</i>	128
CIM8M pCA- <i>fusA</i>	256
CIM8M pCA- <i>potA</i>	128

Tabla 24. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina en la cepa CIM8M complementada. Las concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina para la cepa CIM8M complementada con los diferentes plásmidos se realizó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (15 µg/ml).

Las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de gentamicina indican que la complementación de la cepa CIM8M con los plásmidos pCA-*atpG*, pCA-*fhuA* y pCA-*potA* genera un incremento en la fase *lag* del crecimiento bacteriano respecto a su control en todas las condiciones evaluadas (Figura 20). En presencia de gentamicina, a excepción de las cepas

CIM8M pCA-*cyoA* y CIM8M pCA-*fusA*, la complementación con el fenotipo silvestre de los genes mutados disminuye la biomasa total. Se observa también que a concentraciones de gentamicina de 2 µg/ml y 32 µg/ml, hay un aumento en el tiempo de duplicación de todas las cepas complementadas, mientras que, a una concentración de gentamicina de 128 µg/ml éste disminuye para la cepas CIM8M pCA-*cyoA* y CIM8M pCA-*fusA* (Tabla 25). En esta última condición, las cepas CIM8M pCA-*atpG*, CIM8M pCA-*fhuA* y CIM8M pCA-*potA* no presentaron crecimiento (Figura 20-D).

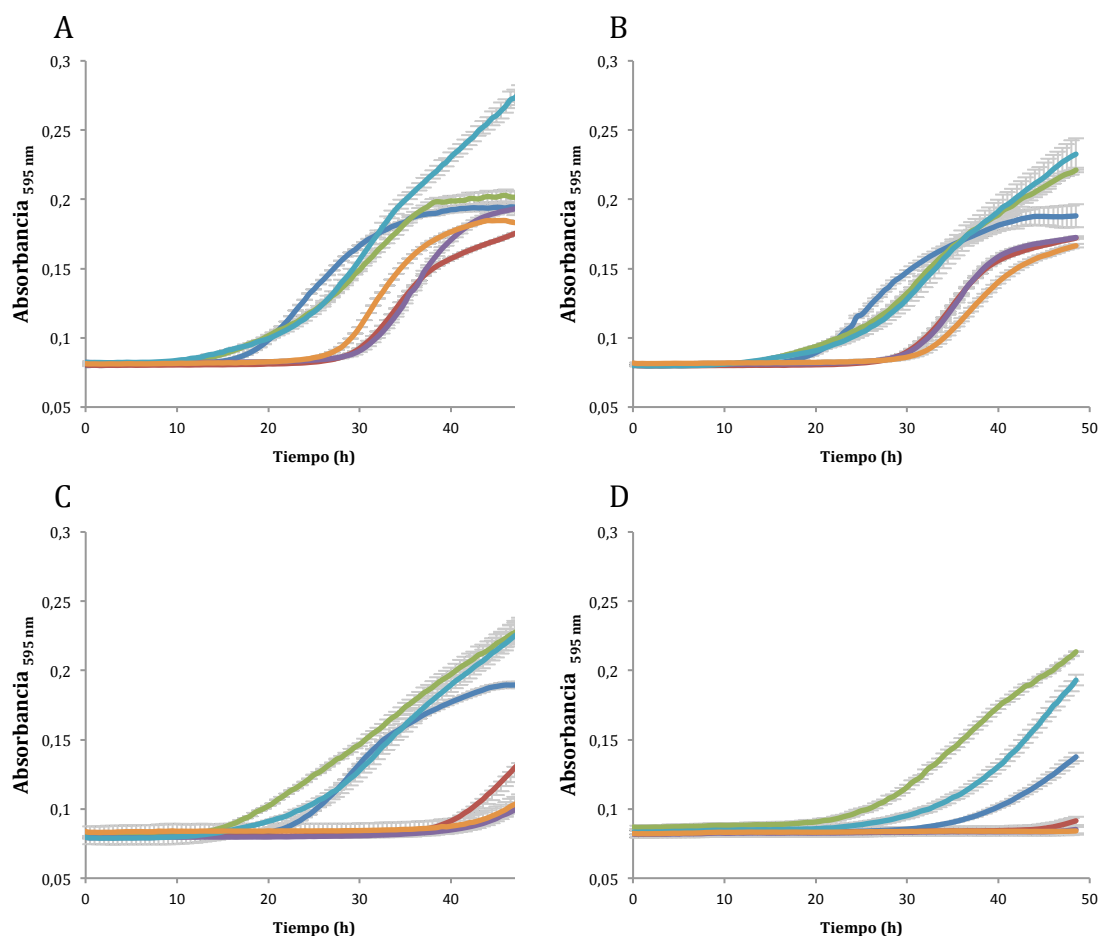


Figura 20. Curvas de crecimiento de la cepa CIM8M complementada. El crecimiento de la cepa CIM8M complementada con los plásmidos pCA24N (—), pCA-*atpG* (—), pCA-*cyoA* (—), pCA-*fhuA* (—), pCA-*fusA* (—) y pCA-*potA* (—) fue evaluado en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (15 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina. **A:** Sin gentamicina. **B:** Gentamicina 4 µg/ml. **C:** 32 µg/ml. **D:** 64 µg/ml.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)			
	Sin gentamicina	Gentamicina 2 µg/ml	Gentamicina 32 µg/ml	Gentamicina 128 µg/ml
CIM8M pCA24N	613	527	665	1072
CIM8M pCA- <i>atpG</i>	563	579	758	s/c
CIM8M pCA- <i>cyoA</i>	885	761	1060	924
CIM8M pCA- <i>fhuA</i>	545	555	1069	s/c
CIM8M pCA- <i>fusA</i>	713	774	840	860
CIM8M pCA- <i>potA</i>	463	664	960	s/c

Tabla 25. Tiempos de duplicación de CIM8M complementada. Tiempos de duplicación de la cepa CIM8M complementada, en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (15 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina a diferentes concentraciones, mediante el programa informático GrowthRates. s/c: sin crecimiento.

Las curvas de crecimiento obtenidas permiten observar también que al complementar CIM8M con el plásmido pCA-*fusA*, la cepa presenta un mayor crecimiento que CIM8M pCA24N, tanto en presencia como en ausencia de gentamicina. A su vez, la complementación con pCA-*cyoA* no afecta la resistencia a gentamicina en comparación con la cepa CIM8M pCA24N. Las cepas CIM8M pCA-*atpG*, CIM8M pCA-*fhuA* y CIM8M pCA-*potA* presentan menor crecimiento en todas las condiciones evaluadas.

4.5.3 Efecto de las mutaciones comunes sobre las variaciones en la sensibilidad a antibióticos de la cepa CIM8M

CIM8M presenta cambios en el perfil de sensibilidad a antibióticos respecto a su ancestro MG1655, específicamente, una mayor sensibilidad a cloranfenicol y trimetoprim, y un aumento en la resistencia a rifampicina y fosfomicina. Para determinar si las mutaciones en los genes *atpG*, *cyoA*, *fhuA*, *fusA* y *potA* se relacionan con estos cambios, se evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias de trimetoprim y fosfomicina para la cepa CIM8M complementada con los genes mencionados. La resistencia a rifampicina de esta cepa se debe a una mutación en el gen *rpoB*, por lo que este antibiótico no fue evaluado. Tampoco fue posible evaluar el efecto de la complementación sobre la sensibilidad a cloranfenicol, debido a que el plásmido pCA24N confiere resistencia a este antibacteriano. Según los resultados obtenidos, la complementación con los genes previamente señalados no revierte el perfil de sensibilidad a los antibióticos fosfomicina y trimetoprim (Tabla 26).

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)	
	FOS	TRI
CIM8M pCA24N	32	0,25
CIM8M pCA- <i>atpG</i>	32	0,25
CIM8M pCA- <i>cyoA</i>	32	0,25
CIM8M pCA- <i>fhuA</i>	16	0,125
CIM8M pCA- <i>fusA</i>	32	0,5
CIM8M pCA- <i>potA</i>	32	0,5

Tabla 26. Concentraciones mínimas inhibitorias de fosfomicina y trimetoprim en CIM8M complementada. Las concentraciones mínimas inhibitorias de fosfomicina (FOS) y trimetoprim (TRI) se evaluaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (15 µg/ml).

El aumento en la sensibilidad a trimetoprim de la cepa CIM8M podría estar relacionado con la alteración de la cadena transportadora de electrones, ya que este antibiótico es expulsado a través del sistema AcrAB-TolC (Nishino & Yamaguchi, 2001). Este transportador utiliza la fuerza protón motriz para la expulsión de sustratos de la célula (Tikhonova & Zgurskaya, 2004), por lo que la alteración de la cadena de transporte de electrones disminuiría su actividad, aumentando la sensibilidad a trimetoprim. Lo anterior podría estar relacionado también al aumento de la sensibilidad de esta cepa a cloranfenicol. Según los resultados obtenidos mediante la determinación de la capacidad metabólica de la cepa, la resistencia a fosfomicina podría estar relacionada a la disminución del ingreso de este antibiótico a la célula. En la actualidad se ha identificado que uno de los mecanismos de ingreso de fosfomicina a la célula es a través del transportador UhpT (Takahata et al., 2010), el cual tiene como sustrato natural a glucosa-6-fosfato (Ambudkar, Anantharam, & Maloney, 1990). La incapacidad de esta cepa de utilizar este azúcar fosfatado como única fuente de energía y carbono, sin afectar la capacidad de utilizar glucosa (Anexo I, Tabla A2), permite inferir que esta imposibilidad se basa en defectos en el transporte de este compuesto.

4.5.4 Evaluación del efecto de las mutaciones presentes en CIM8M sobre la resistencia a gentamicina

Para determinar el efecto individual de las mutaciones que presenta CIM8M sobre la resistencia a gentamicina, se reprodujeron, de forma individual, las mutaciones en los genes *fhuA*, *fusA* y *potA* de la cepa CIM8M en la cepa MG1655 mediante recombinación homóloga. De esta manera, se obtuvieron las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208 (Tabla 27). No fue posible obtener cepas derivadas de MG1655 que incorporasen las mutaciones en *atpG* y *cyoA*. La evaluación del efecto de las mutaciones señaladas sobre la resistencia a gentamicina se llevo a cabo mediante la determinación de la CMI de gentamicina para estas cepas, así como también mediante el análisis de las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de gentamicina.

Cepa	Gen mutado	Cambio aminoácido	Concentración mínima inhibitoria de gentamicina (µg/ml)
FhuA197	<i>fhuA</i>	V197cml	0,25
EFG593	<i>fusA</i>	F593L	2
PotA208	<i>potA</i>	Q208L	1

Tabla 27. Características de las cepas mutantes en los genes *fhuA*, *fusA* y *potA*.

Los resultados indican que las cepas EFG593 y PotA208 presentan un incremento en la CMI de gentamicina respecto a su ancestro MG1655 (Tabla 29), siendo éste mayor para la cepa EFG593. Para la cepa FhuA197 no se observan diferencias entre su CMI de gentamicina y la de su ancestro.

Las curvas de crecimiento de las cepas mutantes (Figura 21) indican que éstas no presentan diferencias en la velocidad de crecimiento, mayores al 5 %, respecto a MG1655 en ausencia de gentamicina. A una concentración de gentamicina de 0,5 µg/ml, se observa que las cepas MG1655 y FhuA197 no presentan crecimiento a las 48 horas, mientras que las cepas EFG593 y PotA208 presentan crecimiento y un aumento en la fase *lag* respecto a la condición control (Tabla 28). De las cuatro cepas mutantes, EFG593 presenta mayor crecimiento en presencia de gentamicina, y FhuA197 es la cepa con mayor sensibilidad.

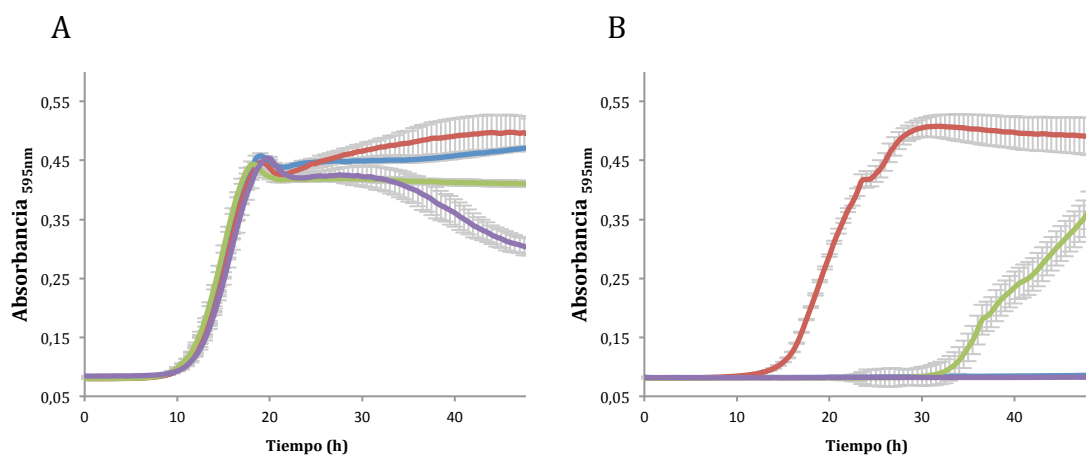


Figura 21. Curvas de crecimiento de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208. Curvas de crecimiento de las cepas MG1655 (—), FhuA197 (—), EFG593 (—) y PotA208 (—), en medio mínimo M9 suplementado con glucosa en presencia y ausencia de gentamicina. **A:** Sin gentamicina. **B:** Gentamicina 0,5 µg/ml.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)	
	Sin gentamicina	Gentamicina 0,5 µg/ml
MG1655	174	s/c
FhuA197	166	s/c
EFG593	166	177
PotA208	162	215

Tabla 28. Tiempos de duplicación de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208. Tiempos de duplicación de las mutantes construidas en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en presencia y ausencia de gentamicina. s/c: sin crecimiento.

4.5.5 Evaluación del efecto de la complementación de las cepas mutantes en *fhuA*, *fusA* y *potA* sobre el crecimiento bacteriano y la sensibilidad a gentamicina

Para evaluar el efecto de la complementación de *fhuA*, *fusA* y *potA* en las mutantes construidas, las cepas fueron complementadas con los genotipos silvestres de estos genes insertos en el plásmido pCA24N, utilizando este último como control. El efecto de la expresión de los fenotipos silvestres de los genes *fhuA*, *fusA* y *potA* sobre la sensibilidad a gentamicina se evaluó mediante la determinación de las CMI de este antibiótico y la determinación de las curvas de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina.

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)
MG1655 pCA24N	0,25
MG1655 pCA- <i>fhuA</i>	0,125
MG1655 pCA- <i>fusA</i>	0,25
MG1655 pCA- <i>potA</i>	0,25
FhuA197 pCA24N	0,25
FhuA197 pCA- <i>fhuA</i>	0,25
EFG593 pCA25N	2,0
EFG593 pCA- <i>fusA</i>	1,0
PotA208 pCA24N	1,0
PotA208 pCA- <i>potA</i>	0,5

Tabla 29. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208 complementadas. Las concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina para las cepas mutantes complementadas se determinó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml). Cada cepa se evaluó en triplicado.

Las CMI de gentamicina de las cepas evaluadas permiten establecer que la complementación de las cepas mutantes EFG593 y PotA208 con el genotipo silvestre de los genes afectados restituye parcialmente el fenotipo ancestral (Tabla 29).

Las curvas de crecimiento indican que FhuA197 pCA24N presenta una fase *lag* más prolongada que su ancestro MG1655. Este cambio en el crecimiento bacteriano se restituye al complementar FhuA197 con pCA-*fhuA*. Es posible observar también que la mutación en el gen *fhuA* genera una disminución en el crecimiento a una concentración de gentamicina de 0,25 µg/ml (Figura 22-C). Al complementar esta cepa con el gen silvestre de *fhuA*, este efecto sobre el crecimiento se revierte parcialmente. A una concentración de gentamicina de 1 µg/ml, no se observa crecimiento de ninguna de las cepas evaluadas. Lo anterior confirma que la mutación en *fhuA* presente en FhuA197 no confiere, de manera independiente, resistencia a gentamicina.

Respecto a la velocidad de duplicación en ausencia de gentamicina y en presencia de este antibiótico a una concentración de 0,125 µg/ml, no se observan cambios en la velocidad de crecimiento (mayores al 5%) respecto al control, para cada caso. A una concentración de gentamicina de 0,25 µg/ml, la expresión del plásmido pCA-*fhuA* disminuye el tiempo de duplicación en MG1655 y en FhuA197 (Tabla 30).

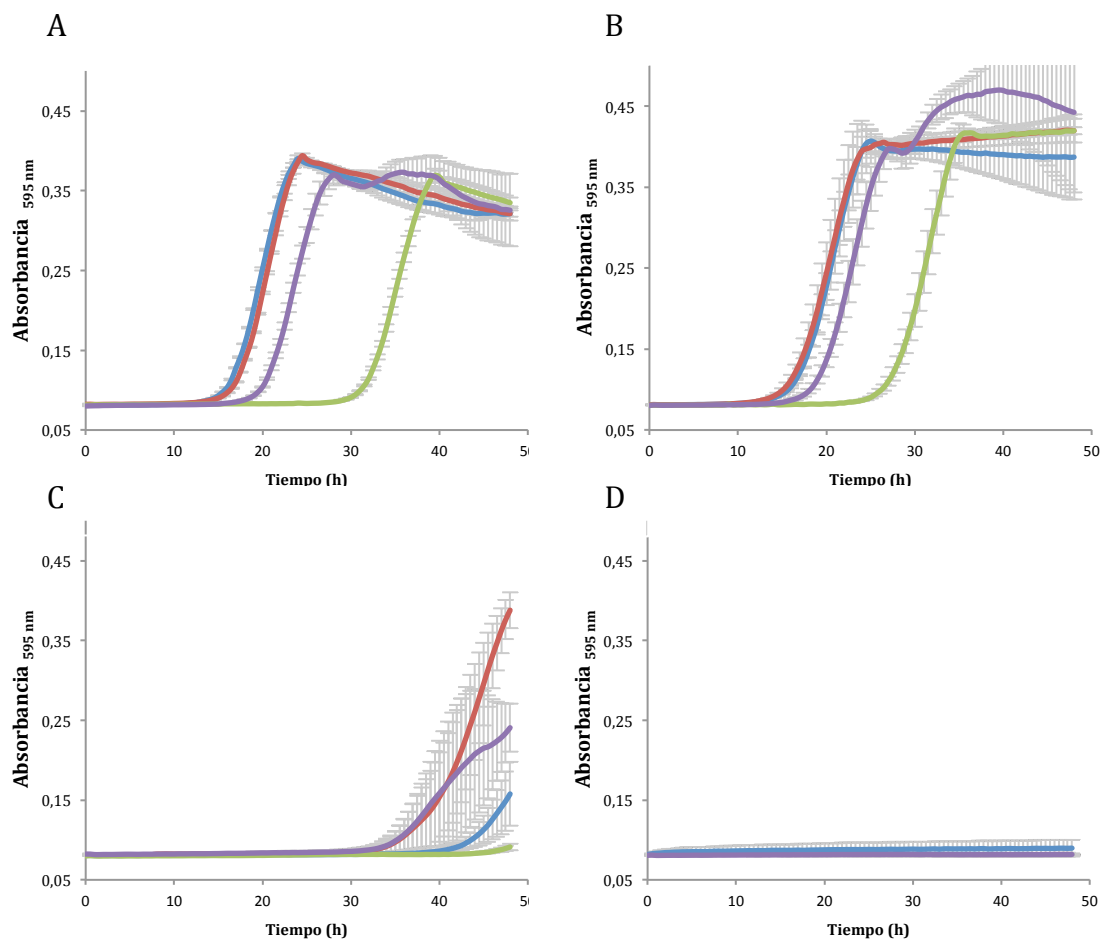


Figura 22. Curvas de crecimiento de FhuA197 complementada. Curvas de crecimiento de las cepas FhuA197 pCA24N (—) y FhuA197 pCA-*fhuA* (—) en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina a distintas concentraciones. Como control se utilizaron las cepas MG1655 pCA24N (—) y MG1655 pCA-*fhuA* (—). **A:** Sin gentamicina. **B:** Gentamicina 0,125 µg/ml. **C:** Gentamicina 0,25 µg/ml. **D:** Gentamicina 1 µg/ml.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)			
	Sin gentamicina	Gentamicina 0,125 µg/ml	Gentamicina 0,25 µg/ml	Gentamicina 1 µg/ml
MG1655 pCA24N	180	196	370	s/c
MG1655 pCA- <i>fhuA</i>	180	205	305	s/c
FhuA197 pCA24N	189	199	1301	s/c
FhuA197 pCA- <i>fhuA</i>	183	195	401	s/c

Tabla 30. Tiempos de duplicación de FhuA197 complementada. Los tiempos de duplicación se evaluaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina. s/c: sin crecimiento.

Para la cepa EFG593, la complementación con pCA-*fusA* no genera cambios en el crecimiento respecto a su control EFG593 pCA24N, ni respecto a su ancestro con ambos plásmidos, en ausencia de gentamicina y a una concentración de gentamicina de 0,125 µg/ml (Figura 23-A y 23-B). En estas condiciones tampoco se observan cambios en el tiempo de duplicación de las cepas estudiadas mayores al 5% (Tabla 31). A 0,25 µg/ml de gentamicina, las cepas EFG593 pCA24N y EFG593 pCA-*fusA* presentan mayor crecimiento respecto a su ancestro con ambos plásmidos (Figura 23-C). En esta condición no se observan diferencias en la velocidad de crecimiento entre la cepa mutante y la mutante complementada, sin embargo, sí con respecto a la cepa silvestre, tanto con el plásmido control como con el plásmido expresando *fusA*. A una concentración gentamicina de 1 µg/ml, la cepa EFG593 pCA24N presenta mayor crecimiento que la cepa EFG593 complementada con el fenotipo silvestre de *fusA*, pero con un mayor tiempo de duplicación (Tabla 33). Las cepas MG1655 pCA24N y MG1655 pCA-*fusA* no presentan crecimiento en esta condición (Figura 23-D).

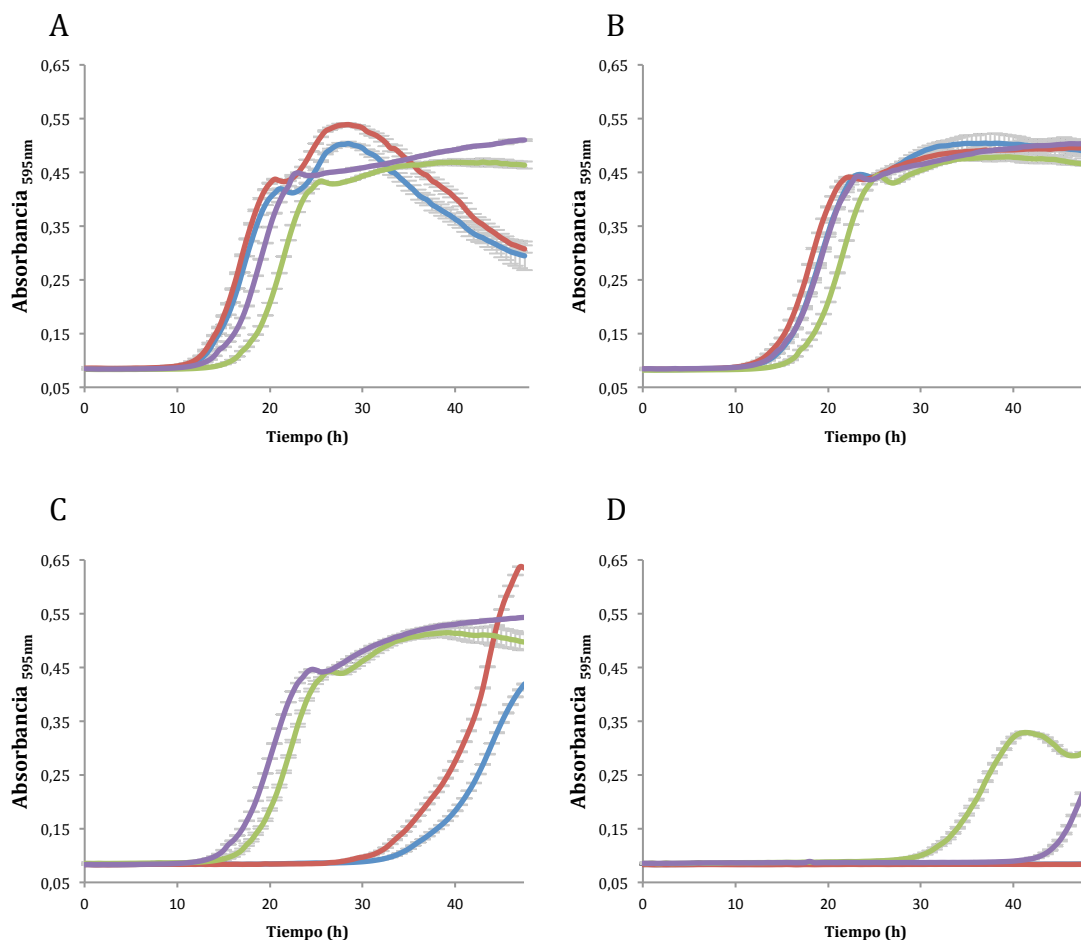


Figura 23. Curvas de crecimiento de EFG593 complementada. Curvas de crecimiento de las cepas EFG593 pCA24N (—) y EFG593 pCA-*fusA* (—) en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina a distintas concentraciones. Como control se utilizaron las cepas MG1655 pCA24N (—) y MG1655 pCA-*fusA* (—). **A:** Sin gentamicina. **B:** Gentamicina 0,125 µg/ml. **C:** Gentamicina 0,25 µg/ml. **D:** Gentamicina 1 µg/ml.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)			
	Sin gentamicina	Gentamicina 0,125 µg/ml	Gentamicina 0,25 µg/ml	Gentamicina 1 µg/ml
MG1655 pCA24N	178	181	306	s/c
MG1655 pCA- <i>fusA</i>	172	177	241	s/c
EFG593 pCA24N	177	183	193	280
EFG593 pCA- <i>fusA</i>	171	184	189	192

Tabla 31. Tiempos de duplicación de EFG593 complementada. Los tiempos de duplicación se evaluaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina, mediante el programa informático GrowthRates s/c: sin crecimiento.

Al complementar la cepa PotA208 con el plásmido pCA-*potA*, no se observan diferencias en el crecimiento bacteriano respecto al plásmido vacío en ausencia de gentamicina y a una concentración de antibiótico de 0,125 µg/ml (Figura 24-A y 24-B). Al incrementar la concentración de gentamicina a 0,25 µg/ml, los resultados indican que la cepa PotA208 pCA24N presenta mayor crecimiento respecto a la cepa complementada (Figura 24-C). En esta misma condición, se observa una disminución de la fase *lag* de la cepa MG1655 expresando el plásmido pCA-*potA*, respecto a su control. A una concentración de 1 µg/ml ninguna de las cepas evaluadas presenta crecimiento (Figura 24-D).

En cuanto a la velocidad de crecimiento, los resultados muestran que la cepa PotA208 presenta un menor tiempo de duplicación que MG1655 en ausencia de gentamicina y a concentraciones de antibiótico de 0,125 y 0,25 µg/ml. La complementación de esta cepa con el fenotipo silvestre de *potA*, genera un aumento en el tiempo de duplicación (Tabla 32). Es posible observar también que la expresión del plásmido pCA-*potA* en MG1655 produce un aumento en la velocidad de crecimiento, principalmente a una concentración de gentamicina de 0,25 µg/ml.

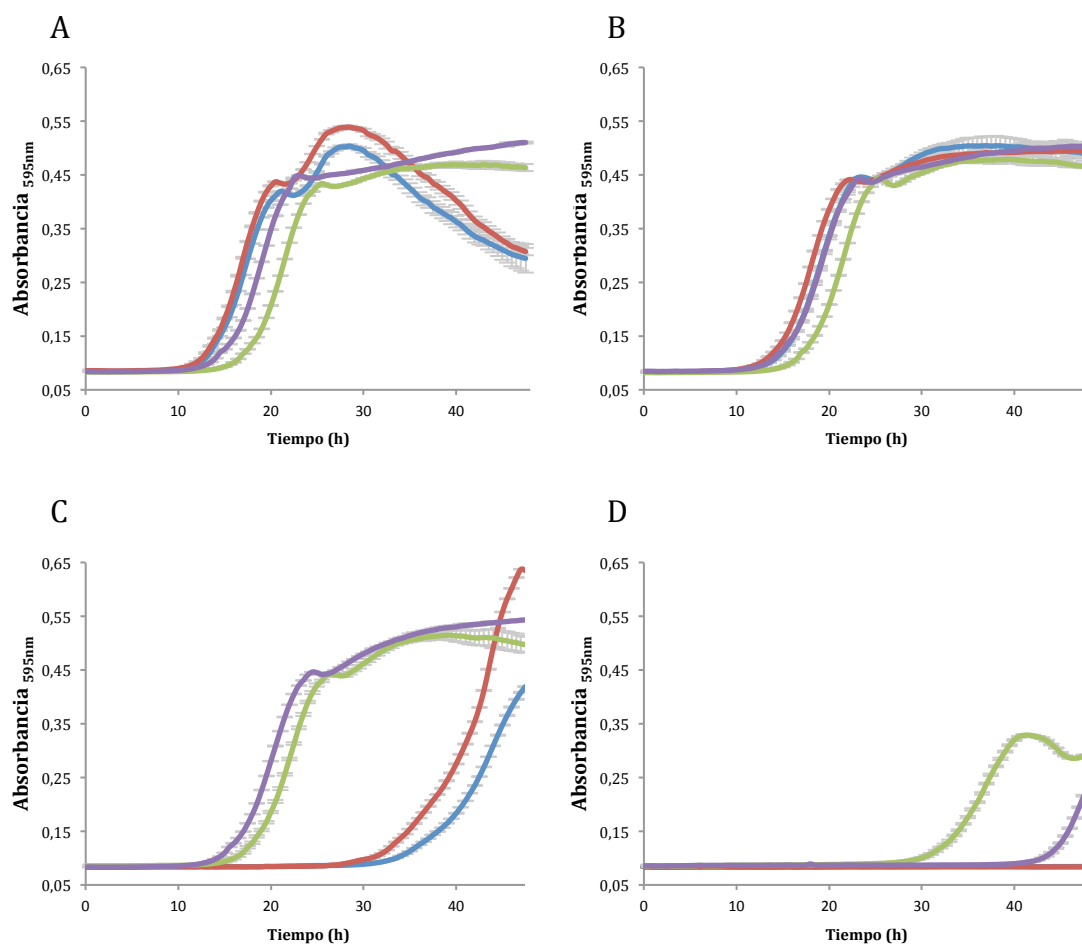


Figura 24. Curvas de crecimiento de PotA208 complementada. Curvas de crecimiento de las cepas PotA208 pCA24N (—) y PotA208 pCA-*potA* (—) en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml), en presencia y ausencia de gentamicina a distintas concentraciones. Como control se utilizaron las cepas MG1655 pCA24N (—) y MG1655 pCA-*potA* (—). **A:** Sin gentamicina. **B:** Gentamicina 0,125 µg/ml. **C:** Gentamicina 0,25 µg/ml. **D:** Gentamicina 1 µg/ml.

Cepa	Tiempo de duplicación (min)			
	Sin gentamicina	Gentamicina 0,125 µg/ml	Gentamicina 0,25 µg/ml	Gentamicina 1 µg/ml
MG1655 pCA24N	178	181	306	s/c
MG1655 pCA- <i>potA</i>	170	180	217	s/c
PotA208 pCA24N	151	147	191	s/c
PotA 208 pCA- <i>potA</i>	171	174	209	s/c

Tabla 32. Tiempos de duplicación de PotA208 complementada. Los tiempos de duplicación se evaluaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y cloranfenicol (50 µg/ml) en presencia y ausencia de gentamicina, mediante el programa informático GrowthRates. s/c: sin crecimiento.

4.5.6 Estimación de la contribución de las mutaciones en *atpG* y *cyoA* a la resistencia a gentamicina

Debido a que no fue posible construir las cepas mutantes en *atpG* y *cyoA*, para evaluar la contribución de estos genes a la resistencia a gentamicina en MG1655, se utilizaron las cepas JW3711 ($\Delta atpG::Kan$) y JW0422 ($\Delta cyoA::Kan$) provenientes de la colección Keio (Baba et al., 2006), con deleciones en *atpG* y *cyoA*, respectivamente. Los resultados indican que no hay diferencias entre la cepa BW25113 silvestre y sus derivadas mutantes de delección en *atpG* y *cyoA* (Tabla 33).

Cepa	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)
BW25113	0,25
JW3711	0,25
JW0422	0,5

Tabla 33. Concentraciones mínimas inhibitorias de gentamicina de las cepas mutantes en genes *atpG* y *cyoA*. Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, tras 48 horas de incubación.

4.5.7 Efecto de las mutaciones individuales presentes en CIM8M sobre la sensibilidad a cloranfenicol

Debido a la imposibilidad de evaluar la sensibilidad a cloranfenicol en la cepa CIM8M complementada con los genotipos silvestres de *atpG*, *cyoA*, *fhuA*, *fusA* y *potA*, el efecto de estas mutaciones sobre este fenotipo se evaluó utilizando las cepas JW3711($\Delta atpG::Kan$), JW0422($\Delta cyoA::Kan$), FhuA197, EFG593 y PotA208, mediante la determinación de la CMI de este antibiótico. Los resultados indican que las mutaciones en estos genes afectan ligeramente la sensibilidad a cloranfenicol, de manera individual (Tabla 34).

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)
BW25113	4
JW3711	8
JW0422	4
MG1655	4
FhuA197	2
EFG593	2
PotA208	4

Tabla 34. Concentraciones mínimas inhibitorias de cloranfenicol de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208. Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, tras 48 horas de incubación.

4.5.8 Sensibilidad a estrés oxidativo

Para evaluar si la resistencia a gentamicina en la cepa CIM8M se asocia a un aumento en la resistencia a estrés oxidativo, la sensibilidad a éste se determinó para las cepa CIM8M y CIM8M complementada con los fenotipos silvestres de los genes mutantes, así como también para la cepa MG1655 y las cepas con mutaciones puntuales. El estrés oxidativo de las células se evaluó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, en este medio suplementado con glucosa e hidróperóxido de tert-butilo (5 µM), y en medio mínimo suplementado con glucosa y gentamicina, a una concentración de antibiótico equivalente a la CMI de cada cepa.

Los resultados indican que en la cepa CIM8M el hidróperóxido de tert-butilo genera mayores niveles de especies reactivas del oxígeno que su ancestro (Figura 25), lo cual se relaciona a los resultados obtenidos previamente respecto a la sensibilidad a peróxido de hidrógeno. No se observa un aumento del estrés oxidativo en presencia de gentamicina para estas cepas. La complementación de CIM8M con el genotipo silvestre de *atpG* y *cyoA* genera una disminución del estrés oxidativo en la célula, lo cual se relaciona con la función de estos genes.

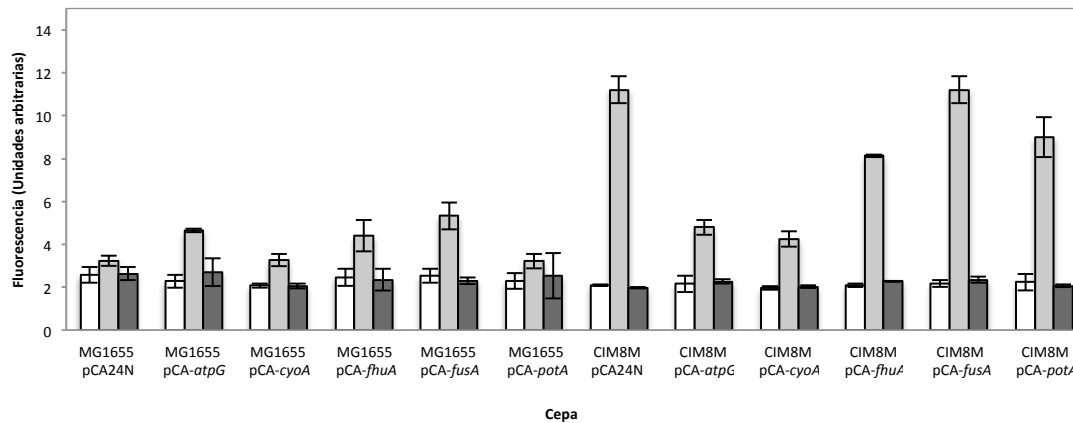


Figura 25. Estrés oxidativo de las cepas MG1655 y CIM8M complementadas. El nivel de estrés oxidativo se evaluó utilizando el reactivo acetato de 2,7 diclorofluoreceína y la emisión de fluorescencia de su derivado 2,7 diclorofluoresceína. Para cada cepa se evaluaron tres condiciones: medio mínimo suplementado con glucosa (□), medio mínimo suplementado con glucosa e hidróperóxido de *tert*-butilo (▨), y medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (■). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos dos replicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada muestra.

Para evaluar la contribución de cada mutación en el aumento en la sensibilidad de la sensibilidad a especies reactivas del oxígeno en CIM8M, ésta se evaluó en las cepas mutantes en *fhuA*, *fusA* y *potA*, con y sin complementar. Los resultados indican que la mutación en *fusA* de EFG593 contribuye al incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo. La sustitución Q208L en PotA no parece afectar de manera evidente a la célula (Figura 26).

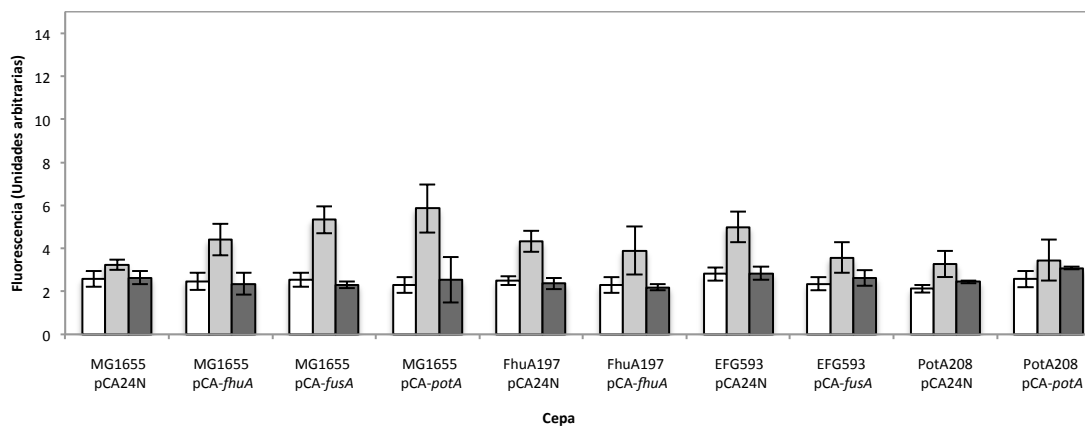


Figura 26. Estrés oxidativo de las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208. El nivel de estrés oxidativo se evaluó utilizando el reactivo acetato de 2,7 diclorofluoreceína y la emisión de fluorescencia de su derivado 2,7 diclorofluoresceína. Para cada cepa se evaluaron tres condiciones: medio mínimo suplementado con glucosa (□), medio mínimo suplementado con glucosa e hidróperóxido de *tert*-butilo (▨), y medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (■). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos dos replicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada muestra.

Para evaluar la contribución de la delección de *cyoA* y *atpG* al estrés oxidativo se utilizaron las cepas JW3711 y JW0422 provenientes de la colección Keio (Baba et al., 2006). Los resultados obtenidos indican que la delección del gen *cyoA* genera un incremento en la sensibilidad a especies reactivas del oxígeno, la cual se revierte parcialmente al expresar el plásmido con el genotipo silvestre de este gen. La delección de *atpG* no genera cambios en el nivel de estrés oxidativo evaluado mediante la emisión de fluorescencia (Figura 27).

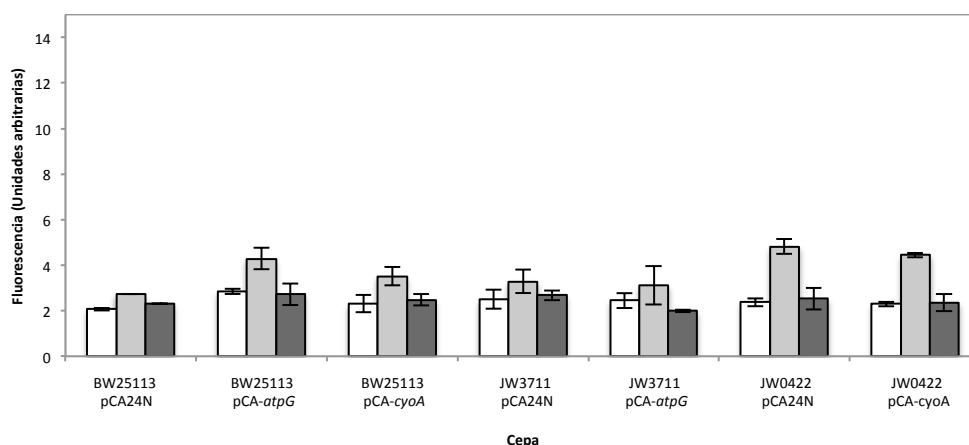


Figura 27. Estrés oxidativo de las cepas JW3711 y JW0422. El nivel de estrés oxidativo se evaluó utilizando el reactivo acetato de 2,7 diclorofluorecín y la emisión de fluorescencia de su derivado 2,7 diclorofluoresceína. Para cada cepa se evaluaron tres condiciones: medio mínimo suplementado con glucosa (□), medio mínimo suplementado con glucosa e hidróperóxido de *tert*-butilo (■), y medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (■). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos dos replicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada muestra.

4.5.9 Activación del sistema SOS

Para determinar si las mutaciones en los genes *fhuA*, *fusA* y *potA* generan una mayor activación del sistema SOS, las cepas FhuA197, EFG593 y PotA208 fueron transformadas con el vector pSC101-*PrecA*::GFP. Este vector presenta una fusión transcripcional del promotor de *recA* a GFP, permitiendo cuantificar así la activación del sistema SOS. La activación de éste sistema se evaluó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, así como también en presencia de gentamicina y ciprofloxacino. Los resultados obtenidos indican que las cepas mutantes no presentan diferencias en relación a la activación del sistema SOS respecto a su ancestro en ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 28). Es posible observar también que la adición de gentamicina al medio de cultivo no genera un incremento en los niveles de activación de este sistema. La exposición a ciprofloxacino genera un aumento en la actividad del sistema SOS, lo cual concuerda con lo establecido en la literatura (Newmark, O'Reilly, Pohlhaus, & Kreuzer, 2005; Thi et al., 2011).

Debido a que CIM8M presenta resistencia tanto a gentamicina como a kanamicina, no fue posible evaluar la activación del sistema SOS en esta cepa. Tampoco fue posible evaluar la activación de este sistema en JW3711 y JW0422, debido a su resistencia a kanamicina.

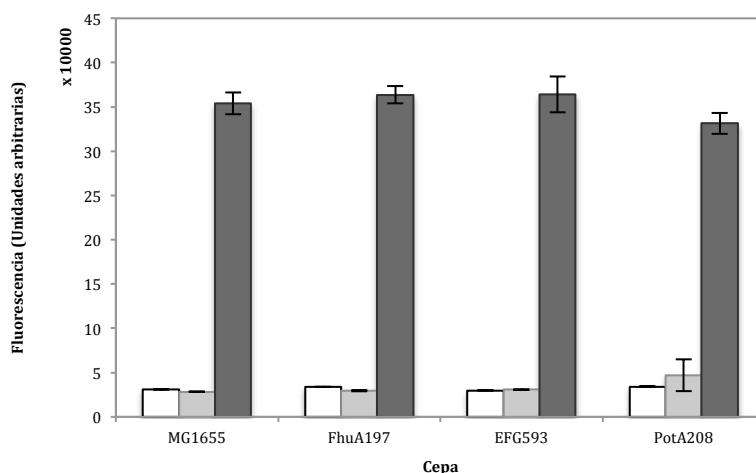


Figura 28. Efecto sobre la transcripción de *PrecA::GFP*. El efecto de las transcripción de *PrecA::GFP* se evaluó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (□), en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y gentamicina (■) y medio mínimo M9 suplementado con glucosa y ciprofloxacino (■). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas independientes.

Discusión

5 Discusión

5.1 Evolución bacteriana hacia la resistencia a gentamicina

La resistencia a antibióticos es uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia a nivel mundial, produciendo sólo en Europa aproximadamente 25.000 muertes al año (ECDC & EMEA, 2009). Desde el descubrimiento de los antibióticos a comienzos del siglo XX y su implementación en la práctica clínica se han identificado microorganismos resistentes a todos los fármacos disponibles. Este trabajo estudió la generación de resistencia a gentamicina y la selección de la misma en presencia de este antibiótico. La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro, ampliamente utilizado para el tratamiento de patologías infecciosas causadas por microorganismos gram negativos, siendo principalmente de uso intrahospitalario. Debido a la importancia clínica de este antibiótico, la generación de resistencia tiene un impacto significativo en términos de salud pública. El mecanismo de resistencia más ampliamente estudiado para la gentamicina es la modificación enzimática del compuesto, sin embargo, la generación de fenotipos bacterianos resistentes a través de mutaciones también ha sido observada. En este contexto, el presente estudio analizó la generación de resistencia a gentamicina en *Escherichia coli* en presencia de este antibiótico como presión de selección. Si bien otros estudios han evaluado la generación de resistencia a aminoglicósidos mediado por mutaciones en *E. coli*, éstos han utilizado otros miembros pertenecientes a esta familia de antibióticos como presión de selección (Lazar et al., 2013). Como modelo de estudio se utilizaron dos fenotipos bacterianos diferentes; la cepa normomutadora MG1655 y su derivada hipermutadora $\Delta dnaQ$. Ambas cepas se sometieron a un proceso evolutivo en cultivos continuos de tipo quimiostato, donde la única variable fue la concentración de antibiótico. Además de mantener las condiciones nutricionales y de crecimiento constantes, los cultivos continuos permitieron optimizar las condiciones de ingreso del antibiótico a la célula, ya que se ha establecido que el ingreso de éste se relaciona a la velocidad de crecimiento (Muir et al., 1985; Muir et al., 1984).

Si bien el desarrollo de resistencia se ha asociado positivamente a cepas bacterianas hipermutadoras, en el presente estudio fue posible aislar cepas bacterianas resistentes a altas concentraciones de gentamicina tanto a partir de la cepa silvestre MG1655 como de su derivada hipermutadora con delección en *dnaQ*, no observándose diferencias significativas en el nivel de resistencia alcanzado entre las cepas derivadas de ambos fenotipos bacterianos. Sin embargo, sí fue posible observar diferencias en las trayectorias evolutivas entre las cepas derivadas de MG1655 y $\Delta dnaQ$, donde, para las cepas derivadas de esta última, las mutaciones fueron identificadas en etapas más tempranas de la evolución. Cabe destacar que, a partir del proceso de evolución de la cepa MG1655, fue posible aislar cepas hipermutadoras (CIM5H y CIM5N), producto de la sustitución H162Q en el gen *dnaQ* que disminuye la efectividad de la actividad enzimática de la subunidad ϵ de la DNA-polimerasa III (Cisneros et al., 2009; Strauss et al., 1997). Tanto las cepas derivadas de MG1655 como de $\Delta dnaQ$ alcanzaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de gentamicina superiores en al menos dos veces la CMI de sus respectivos ancestros. En la actualidad se ha descrito que las mutaciones tienen,

principalmente, un efecto deletéreo en la célula bacteriana, sin embargo, según los parámetros evaluados en este estudio no se observan diferencias importantes entre los fenotipos hipermutador y normomutador de las cepas obtenidas a partir de ambos ensayos de evolución, ni entre los dos fenotipos obtenidos a partir de la evolución de la cepa silvestre. En cuanto al crecimiento bacteriano, no se observa una tendencia diferenciadora en la velocidad de crecimiento que permita establecer que el fenotipo hipermutador genera un coste mayor en el *fitness* bacteriano respecto a las cepas normomutadoras. En cuanto a la capacidad de utilizar diversos compuesto orgánicos como única fuente de energía y carbono, tampoco es posible establecer que el fenotipo hipermutador de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ y de las cepas CIM5H y CIM5N genere un efecto deletéreo para la célula. El aumento en la variabilidad genética ha sido previamente relacionado con la adaptación bacteriana a ambientes determinados, confiriéndole así una ventaja competitiva frente a ciertas condiciones ambientales mas pudiendo generar efectos negativos para la adaptación a otras condiciones (Cooper & Lenski, 2000; Giraud et al., 2001). En relación a lo anterior, se evaluaron los perfiles de sensibilidad a antibióticos de las cepas derivadas de la evolución en presencia de gentamicina. Para ambos fenotipos se observa un aumento en la resistencia a gentamicina y fosfomicina, y un incremento en la sensibilidad a otros antibióticos, lo cual refleja que el fenotipo del ancestro no restringe el proceso de especialización de la célula en el proceso evolutivo.

5.2 Desarrollo y selección de fenotipo hipermutador

Si bien durante el presente estudio no fue posible establecer que el fenotipo hipermutador confiriese una ventaja competitiva para el desarrollo de resistencia a gentamicina, sí fue posible observar el desarrollo espontáneo de un fenotipo hipermutador a partir de la cepa silvestre MG1655 en las cepas CIM5H y CIM5N. Ambas cepas presentan un aumento en la frecuencia de mutantes debido a la sustitución H162Q en la subunidad ϵ de la DNA-polimerasa III codificada por el gen *dnaQ*. Esta mutación se localiza en el sitio catalítico de la enzima, y modificaciones en esta posición producen un aumento en la frecuencia de mutantes de las cepas afectadas (Cisneros et al., 2009; Strauss et al., 1997). Estos resultados se relacionan tanto con la frecuencia de mutantes observada para estas cepas como con el número total de mutaciones presentes en su genoma. Si bien ambas cepas presentan la misma mutación en *dnaQ*, CIM5N presenta una mayor frecuencia de mutantes que CIM5H. En CIM5N, además de la mutación de *dnaQ*, es posible observar una mutación en la proteína MutY. La sustitución C314Y se localiza en la región C-terminal de la proteína, y es en esta región donde se han identificado residuos de gran relevancia para el reconocimiento de 8-oxo guanina y para la actividad catalítica (L. Li & Lu, 2003), por lo que esta mutación podría disminuir la efectividad de la proteína y, con esto, aumentar la frecuencia de mutantes, como se ha observado para otras mutaciones que afectan la actividad de esta proteína (Nghiem, Cabrera, Cupples, & Miller, 1988; Oliver et al., 2000).

No sólo es posible observar un aumento de la frecuencia de mutantes en las cepas derivadas de MG1655. Entre las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$, CIQ1E, CIQ1G y CIQ4J presentan también un aumento en la frecuencia de mutantes, siendo éste mayor para la última cepa. En adición a la delección en *dnaQ*, estas cepas presentan sustituciones aminoacídicas en la proteína del sistema MMR MutS (Junop et al., 2003). Las diferencias en las frecuencias de mutantes entre estas cepas, que para la cepa CIQ4J representa un aumento de alrededor de orden de magnitud, podría relacionarse con la posición de la sustitución aminoacídica en la proteína. Las cepas CIQ1E y CIQ1G presentan la sustitución T564P, mientras que CIQ4J presenta la sustitución I695S. Esta última se localiza en una región altamente conservada de la proteína, por lo que podría afectar la actividad de la misma, y alteraciones en el sistema MMR se relacionan con un aumento de la frecuencia de mutantes (Schofield & Hsieh, 2003).

5.3 Resistencia a gentamicina en *Escherichia coli*

El presente estudio evaluó la generación de resistencia a gentamicina en *E. coli* utilizando la cepa silvestre MG1655 y su derivada hipermutadora $\Delta dnaQ$. A partir de la evolución ambos de fenotipos fue posible aislar sesenta cepas resistentes a altas concentraciones de gentamicina ($\geq 512 \mu\text{g/ml}$). Del total de cepas aisladas se seleccionaron cuatro cepas derivadas de cada fenotipo para su posterior análisis. A partir de la secuenciación de estas ocho cepas fue posible identificar las mutaciones generadas durante el proceso de evolución en presencia de gentamicina. Estas ocho cepas presentan, de manera común, mutaciones en los genes *fhuA* y *fusA*, así como también en los operones *atp*, *cyo* y *potABCD*. Si bien los antibiótico aminoglicósidos, como la gentamicina, tienen como sitio diana el ribosoma bacteriano, en el presente estudio no se detectaron mutaciones en el rRNA. En relación a la síntesis proteica se detectaron mutaciones comunes en el factor de elongación F (EF-G).

5.3.1 Síntesis proteica

El EF-G, codificado por *fusA*, es una proteína involucrada tanto en la translocación del ribosoma, que permite el desplazamiento del tRNA desde el sitio A al sitio P, como en el *reciclaje* del ribosoma para dar inicio a un nuevo ciclo de síntesis proteica (Erbe & Leder, 1968; Ning Gao et al., 2005; Hirokawa et al., 2006; Kiel et al., 2007; Zavialov et al., 2005). Las mutaciones en *fusA* en las cepas resistentes a gentamicina se ubican en las subunidades IV y V de la proteína, las cuales han demostrado ser fundamentales para su actividad (A et al., 1994; Savelsbergh et al., 2000). Mutaciones en este factor han sido relacionadas a la resistencia a gentamicina en concentraciones de antibiótico de hasta $15 \mu\text{g/ml}$. Hasta esta concentración, los antibióticos de tipo aminoglicósido se unen al ribosoma en una relación estequiométrica de 2:1, mientras que sobre ésta esta relación aumenta, no siendo lineal. Los resultados obtenidos durante el presente estudio indican que la mutación en la subunidad IV de EF-G (F593L) aumenta la resistencia a gentamicina, aumentando su CMI en ocho veces respecto a

su ancestro, alcanzando los 2 µg/ml. La detección de mutaciones en *fusA* a partir de etapas tempranas del proceso evolutivo de las cepas MG1655 y $\Delta dnaQ$ concuerda con el nivel de resistencia observado para este genotipo. La complementación de la cepa CIM8M, resistente a gentamicina, con el genotipo silvestre de *fusA* genera una disminución de la CMI de gentamicina de la cepa desde 512 µg/ml hasta 256 µg/ml, sin embargo, produce un aumento del crecimiento bacteriano en términos de biomasa. El aumento en la biomasa corrobora que la sustitución F593L provoca un defecto en el crecimiento bacteriano, lo cual se relaciona con lo establecido previamente en la literatura, donde se estipula que mutaciones en este gen generan una disminución en el crecimiento bacteriano (Hou, Yaskowiak, & March, 1994; Savelsbergh et al., 2000), y que la resistencia a aminoglicósidos mediada por este mecanismo se debe a la disminución de la velocidad de traducción debido a la mutación y, por consiguiente, se generaría un aumento en la fidelidad del proceso, disminuyendo el efecto de los antibióticos aminoglicósidos en la célula bacteriana (Hou, Yaskowiak, et al., 1994). El aumento en el crecimiento bacteriano de la cepa CIM8M complementada con *fusA*, al igual que la detección de mutaciones en el EF-G a partir de etapas tempranas de la evolución bacteriana, se relacionaría a que la contribución de esta mutación al fenotipo de resistencia ocurre sólo a bajas concentraciones de gentamicina. Tanto la disminución en la velocidad de crecimiento, que ha sido asociada con la disminución de ingreso de aminoglicósidos a la célula, como el aumento en la fidelidad del proceso de traducción, contribuirían a la resistencia a gentamicina.

5.3.2 Transporte de hierro

FhuA es un transportador de hierro asociado a ferricromo ubicado en la membrana celular externa. En todas las cepas se produce un cambio en el marco de lectura de la proteína, lo que genera la pérdida de su funcionalidad (Carmel & Coulton, 1991). El ferricromo es un sideróforo que permite la captura de hierro desde el medio extracelular para su transporte y disponibilidad al interior de la célula (Neilands, 1995). Este elemento metálico de transición está involucrado en un sinnúmero de procesos celulares, principalmente en aquellos con actividad de oxido reducción como la respiración celular y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). La concentración intracelular de hierro regula la expresión de diversos genes a través del regulador Fur, que actúa junto a hierro ferroso como co-represor de la transcripción de genes relacionados al ingreso de hierro a la célula, entre otros (Escolar et al., 1999; McHugh et al., 2003; Troxell & Hassan, 2013). Si bien el hierro es fundamental en diversos procesos celulares, altas concentraciones de este elemento pueden generar un efecto tóxico en la célula bacteriana, debido a la reacción de éste con las especies reactivas del oxígeno generadas durante la respiración celular (Andrews, Robinson, & Rodriguez-Quinones, 2003; V. Braun, 1997; Imlay & Linn, 1988). En las cepas resistentes a gentamicina, FhuA presenta cambios en el marco de lectura que afectan residuos esenciales para la funcionalidad de la proteína (Endriss et al., 2003; Endriss & Braun, 2004). El cambio en el marco de lectura a partir del residuo 197 de FhuA en la cepa FhuA197 no genera un aumento en la resistencia a gentamicina, sin embargo, se ha observado que la complementación con el fenotipo silvestre

en CIM8M disminuye el crecimiento celular en medio mínimo M9 suplementado tanto con glucosa como con glucosa y gentamicina, disminuyendo su CMI de gentamicina desde 512 µg/ml hasta 128 µg/ml. Estos resultados permiten suponer que el efecto de la mutación en FhuA sobre la resistencia a gentamicina podría estar relacionada a un efecto beneficioso de ésta sobre el crecimiento bacteriano en presencia de las otras mutaciones identificadas en CIM8M. La complementación de *fhuA* en CIM8M genera una disminución de la biomasa total, así como también un aumento en la fase *lag* del crecimiento bacteriano. La expresión del genotipo silvestre de *fhuA* en CIM8M provoca un aumento en la velocidad de duplicación de la cepa en ausencia de gentamicina. La relación entre la velocidad de crecimiento y resistencia a aminoglicósidos ha sido previamente descrita (Muir et al., 1984), donde a menor velocidad de duplicación menor es la entrada de estos antibióticos a la célula. A pesar de que no se observó un aumento relevante en el tiempo de duplicación en la cepa FhuA197, ni en FhuA197 complementada con *fhuA* silvestre, la disminución de ésta en la cepa CIM8M complementada indica que la mutación de este gen podría contribuir a su fenotipo de resistencia.

5.3.3 Metabolismo energético

E. coli es un microorganismo anaerobio facultativo, es decir, tiene la capacidad de crecer en presencia y ausencia de oxígeno, pudiendo utilizar compuestos diferentes a éste como último aceptor de electrones. La cadena transportadora de electrones se compone de dos elementos principales: deshidrogenasas y oxidasas terminales. Durante la respiración celular se produce un flujo de electrones desde compuestos con la capacidad de donar electrones hacia compuestos aceptores de electrones a través de quinonas (Y. Anraku, 1988; Ingledew & Poole, 1984). Durante el transporte de electrones se genera un flujo de protones hacia el periplasma, creando un gradiente electroquímico, también denominada fuerza protón motriz (FPM), que permite la formación de ATP, así como también dar energía a otros procesos asociados a la membrana plasmática y al flagelo (Yasuhiro Anraku & Gennis, 1987; Matsushita et al., 1984). El presente estudio evaluó la generación de resistencia a gentamicina en condiciones aeróbicas, donde la cadena transportadora de electrones se encuentra compuesta, principalmente, por el complejo NADH deshidrogenasa y la citocromo *bo₃* oxidasa que utiliza oxígeno como último aceptor de electrones para producir agua, generando la FPM utilizada por la ATP sintasa para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Este proceso es de especial importancia para la acción antibacteriana de los antibióticos de tipo aminoglicósidos. La entrada de éstos a la célula bacteriana se compone de tres etapas; la primera es independiente de energía y se basa en una interacción electrostática debido a las carga negativa de la superficie bacteriana, mientras que la segunda y la tercera fase de ingreso dependen de energía, específicamente, de energía generada durante la cadena transportadora de electrones a través del gradiente de protones (Miller et al., 1980; Taber, Mueller, Miller, & Arrow, 1987). Todas las cepas resistentes a gentamicina seleccionadas en este estudio presentan mutaciones en el operón *cyoABCDE* que codifica para la citocromo *bo₃* oxidasa. La cepa CIM8M presenta un cambio en el marco de lectura de *cyoA*. CyoA ha demostrado ser necesaria para el correcto ensamblaje del centro metálico con actividad de oxido reducción

presente en *CyoB*, y mutantes de delección en *cyoA* disminuyen la unión de cobre en la subunidad I codificada por *cyoB* y, con esto, la actividad de oxido-reducción (H. Nakamura et al., 1997).

Previamente, se han relacionado las alteraciones en la cadena transportadora de electrones con una disminución del ingreso de aminoglicósidos a la célula bacteriana (Bryan & Kwan, 1983; Miller et al., 1980), sin embargo, la delección de *cyoA* en la cepa BW25113 provoca un aumento en la CMI de gentamicina desde 0,25 µg/ml hasta 0,5 µg/ml. Este resultado indica que esta mutación genera una ligera disminución en la sensibilidad a gentamicina que podría tener un efecto beneficioso sólo a bajas concentraciones del antibiótico. La complementación de CIM8M con el genotipo silvestre de *cyoA* no genera cambios en el nivel de resistencia a gentamicina de la cepa, lo cual se relacionaría con que la mutación en este gen sólo contribuiría discretamente al fenotipo de resistencia. Según lo observado en las trayectorias evolutivas de las cepas resistentes, mutaciones en el operón *cyo* se observan desde etapas tempranas de la evolución bacteriana hacia la resistencia de gentamicina (4 µg/ml para MG1655 y 0,5 µg/ml para $\Delta dnaQ$). Esto, junto con el discreto efecto de la delección de *cyoA* en BW25113, permiten establecer que la mutación en *cyoA* podría contribuir a la resistencia a gentamicina únicamente a bajas concentraciones de antibiótico. También es posible observar que la complementación de *cyoA* en la cepa CIM8M genera un aumento en la biomasa pero no una mayor velocidad de duplicación.

Otro componente del metabolismo energético afectado en las cepas resistentes a gentamicina es la enzima ATP sintasa. Ésta se encuentra formada por dos unidades, F_1 y F_0 , ubicadas en el espacio citoplasmático y en la membrana interna, respectivamente. La unidad F_1 de la enzima cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, mientras que F_0 forma un canal de protones que expulsa protones hacia el periplasma, contribuyendo a la generación del potencial de membrana y la fuerza protón motriz (Nielsen et al., 1981; Walker et al., 1984). Esta enzima es codificada por *atpIBEFHAGDC* y se ha establecido que su inhibición no genera una alteración en la entrada de aminoglicósidos a la célula, sin embargo, se ha identificado que mutaciones en la subunidad γ de la unidad catalítica pueden generar una *fuga* de protones, alterando el potencial de membrana de la célula (Humbert & Altendorf, 1989). La subunidad γ es codificada por *atpG*, y mutaciones en este gen se han identificado en seis de las ocho cepas resistentes a gentamicina seleccionadas en este estudio. A pesar que la delección de este gen en la cepa BW25113 no provoca una disminución en la sensibilidad a gentamicina, la complementación de CIM8M con el gen silvestre provoca una disminución de la CMI de este antibiótico para esta cepa desde 512 µg/ml hasta los 128 µg/ml. Debido a que el proceso de ingreso de aminoglicósidos se encuentra mediado por el potencial de membrana, la *fuga* de protones a causa de la mutación de subunidad γ de la enzima ATP sintasa afectaría el ingreso del antibiótico a la célula, aumentando la resistencia al mismo. La complementación de la cepa CIM8M con el fenotipo silvestre de esta subunidad produce un aumento en la fase *lag* de crecimiento bacteriano y una disminución de la biomasa total. Debido a que la complementación con *atpG* provoca una disminución en el tiempo de duplicación de la célula en ausencia de gentamicina, se puede inferir que la mutación en este gen disminuye la

velocidad de crecimiento. Esto contribuiría a la resistencia a gentamicina, ya que ha sido previamente descrito una relación inversamente proporcional entre el tiempo de duplicación y la entrada del antibiótico a la célula (Muir et al., 1985; Muir et al., 1984).

5.3.4 Transporte de espermidina

Entre los operones afectados en todas las cepas resistentes a gentamicina se encuentra el operón *potABCD*. Éste codifica para el transportador de espermidina, el cual es dependiente de ATP y permite la entrada, principalmente, de espermidina a la célula, pero también puede transportar otras poliaminas con menor afinidad (Igarashi & Kashiwagi, 1996). Los resultados obtenidos durante este estudio permiten establecer que mutaciones en la subunidad con actividad ATPasa, PotA, generan una disminución en la sensibilidad a gentamicina. La complementación de la cepa CIM8M con el fenotipo silvestre de esta proteína disminuye cuatro veces la CMI de gentamicina, hasta los 128 µg/ml. Lo anterior se correlaciona con la disminución de la sensibilidad a gentamicina observado en la cepa PotA208. Al igual que lo que ocurre para la complementación de CIM8M con los genotipos silvestres de *atpG* y *fhuA* en ausencia del antibiótico, la complementación con *potA* provoca un aumento en la velocidad de crecimiento de la cepa, lo cual podría estar relacionado al aumento de la sensibilidad a gentamicina observada. La principal fuente de poliaminas en la célula bacteriana es la biosíntesis de las mismas a partir de los aminoácidos ornitina, arginina y lisina (Morris & Pardee, 1966; C. W. Tabor & Tabor, 1985; H. Tabor, Rosenthal, & Tabor, 1958), sin embargo, no se observa actividad ornitina descarboxilasa en las cepas MG1655 y $\Delta dnaQ$, así como tampoco en sus derivadas. Es por lo anterior que alteraciones en el transportador de espermidina podrían tener un mayor impacto en el metabolismo de la célula. Debido a que las poliaminas regulan positivamente la traducción de *cya*, la alteración del transportador PotABCD podría disminuir esta actividad, generando una alteración en el metabolismo energético de la célula mediado por AMPc (Yoshida et al., 2004). Las poliaminas también están involucradas en el transporte de hierro a través de la regulación de la traducción del regulador FecI. La traducción de Fis, al igual que Cya, FecI y RpoS, también es inducida por moléculas de tipo poliaminas (Yoshida et al., 2004). Entre las funciones afectadas por este regulador se encuentra el metabolismo energético, el catabolismo de compuestos orgánicos, el metabolismo de aminoácidos y la protección celular (Bradley et al., 2007). La cepa CIM8M presenta una disminución en la capacidad de utilizar diversos compuestos orgánicos como única fuente de energía y carbono, entre los que destacan aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares. Este fenotipo podría estar relacionado con la mutación de esta cepa en *potA*. Otra de las proteínas reguladas directamente por poliaminas es OppA, una proteína de unión a oligopéptidos que se ha relacionado con el ingreso de aminoglicósidos a la célula, donde la disminución de su expresión provoca una disminución de la sensibilidad a estos antibióticos (Acosta, Ferreira, Padilla, Ferreira, & Costa, 2000). Debido a la relevancia de las poliaminas, esta mutación podría actuar potenciando los efectos sobre el metabolismo energético y la concentración intracelular de hierro, debido a una disminución de la concentración intracelular de poliaminas. Sin embargo, el medio de cultivo utilizado en el presente estudio

no contiene poliaminas, por lo que se hace necesario evaluar si éste presenta este tipo de compuestos en traza. Si bien las poliaminas son de gran importancia para la fisiología bacteriana, PotABCD no sólo presenta la capacidad de transportar este tipo de compuestos. Según lo establecido, antibióticos de tipo aminoglicósido podrían ser transportados por éste. De esta manera, la mutación presente en CIM8M podría afectar directamente el ingreso de gentamicina en *E. coli* (Holtje, 1978).

5.4 Modificación de los perfiles de sensibilidad a antibióticos

Los resultados obtenidos mediante la determinación de la CMI de distintos antibióticos en las cepas aisladas a partir de ambos ensayos de evolución permitieron establecer que estas cepas presentan modificaciones en la sensibilidad a diversos antimicrobianos. Es posible observar que la sensibilidad a trimetoprim y a cloranfenicol aumenta en al menos un 30% del total de cepas aisladas. Un aumento en la resistencia a fosfomicina se observó en el 100% de las cepas resistentes a gentamicina, mientras que la resistencia a rifampicina se presenta en todas las cepas derivadas de MG1655.

El aumento en la sensibilidad a cloranfenicol como consecuencia del desarrollo de resistencia a aminoglicósidos ha sido previamente descrito en *E. coli* (Imamovic & Sommer, 2013; Lazar et al., 2013), sugiriendo que este fenotipo se basa en alteraciones en el metabolismo energético, sin embargo, el mecanismo exacto no se ha sido dilucidado. Debido a que las cepas resistentes a gentamicina presentan mutaciones que afectan el metabolismo energético de la célula, esto podría afectar la actividad de bombas de expulsión cuya energía se base en la generación de la fuerza protón motriz. Una de estas bombas es AcrAB-TolC, un sistema de expulsión de compuestos tóxicos que se expresa constitutivamente en *E. coli* y que no tiene la capacidad de expulsar aminoglicósidos (Nishino & Yamaguchi, 2001). Ya que tanto el cloranfenicol como el trimetoprim son sustratos de este transportador constitutivo, la disminución de su actividad debido a las alteraciones en el metabolismo energético aumentaría su concentración intracelular y, con esto, el efecto tóxico de estos antibióticos en la célula. Debido a que ni las cepas mutantes en *atpG*, *cyoA*, *fhuA*, *fusA* y *potA*, para el cloranfenicol, ni la complementación de CIM8M con los genotipos silvestres de los genes mutados, para trimetoprim, presentaron cambios en la sensibilidad a estos antibióticos, es posible que estos fenotipos requieran de dos o más mutaciones para su desarrollo.

Un aumento en la resistencia a fosfomicina se observó en todas las cepas resistentes a gentamicina. Según los resultados obtenidos durante este estudio, este fenotipo se relacionaría con una disminución en la permeabilidad del antibiótico. El mecanismo de ingreso de fosfomicina a la célula bacteriana está mediada por los transportadores UhpT y GlpT, cuyos sustratos naturales son glucosa-6-fosfato y glicerol-3-fosfato, respectivamente (Ambudkar et al., 1990; Lemieux, Huang, & Wang, 2004). De las cepas resistentes a gentamicina seleccionadas, únicamente CIM5N conserva la capacidad de utilizar ambos

sustratos como fuente de energía y carbono, mientras que CIM5H, CIM8C, CIM8M, CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J han perdido la capacidad de utilizar al menos uno de estos sustratos como única fuente de energía y carbono. Debido a que las cepas que no pueden utilizar glicerol-3-fosfato o glucosa-6-fosfato mantienen la capacidad de utilizar glicerol y glucosa como fuente de energía y carbono, este defecto podría relacionarse directamente a su transporte. La resistencia a fosfomicina ha sido previamente asociada a mutaciones en *cya* (Takahata et al., 2010). Si bien, las mutaciones en el operón *potABCD*, junto con la ausencia de actividad ornitina descarboxilasa, podrían afectar la traducción de este gen, no se observaron cambios en la resistencia a fosfomicina al complementar la cepa CIM8M complementada con el genotipo silvestre de *potA*, por lo que es probable que este mecanismo no esté involucrado en este fenotipo bacteriano.

El aumento en la resistencia a rifampicina en las cepas derivadas de MG1655 se debe a la sustitución H526Y presente en todas las cepas seleccionadas provenientes de este ancestro (Cavusoglu et al., 2006; Jin & Gross, 1988; Ma et al., 2006; Paluch-Oles et al., 2009). La selección de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina ha sido previamente descrito incluso en ambientes libres de este u otros antibióticos (Rodríguez-Verdugo et al., 2013). Esta sustitución aminoacídica ha demostrado no afectar el *fitness* bacteriano (Borrell et al., 2013; Enne et al., 2005), por lo que no estaría involucrada en la disminución de la biomasa y de la velocidad de crecimiento observadas en CIM8M y en las otras cepas resistentes a gentamicina.

5.5 Estrés oxidativo

El efecto tóxico de los antibióticos, incluyendo los aminoglicósidos, en la célula bacteriana ha sido previamente relacionado a un aumento del estrés oxidativo (Albesa et al., 2004; Kohanski et al., 2007), por lo que la resistencia a estos compuestos se ha asociado en una disminución de esta sensibilidad, sin embargo, los resultados obtenidos durante este estudio no muestran una disminución en el estrés oxidativo de las cepas resistentes a gentamicina. Por el contrario, se observa un aumento en la sensibilidad a compuestos oxidantes como el hidróperóxido de tert-butilo y el peróxido de hidrógeno en las cepas resistentes a gentamicina. Tampoco ha sido posible observar un aumento en el estrés oxidativo en el ancestro MG1655 o en la cepa CIM8M en presencia de gentamicina, en las condiciones de este estudio. La evaluación, de manera independiente, de las mutaciones presentes en CIM8M permite establecer que la sustitución F593L en EF-G contribuye al aumento en los niveles de ROS en presencia de agentes oxidantes. El EF-G es una proteína altamente sensible al estrés oxidativo tanto en procariotas como en eucariotas, siendo la subunidad IV de la proteína la principal diana de las especies reactivas del oxígeno (Cabisco, Piulats, Echave, Herrero, & Ros, 2000; Dukan & Nyström, 1999; Tamarit, Cabisco, & Ros, 1998). La delección en *cyoA* en la cepa JW3711 también provoca este efecto, lo cual se relaciona con lo previamente observado donde alteraciones en la cadena transportadora de electrones aumentan la sensibilidad a especies reactivas del oxígeno (Lindqvist, Membrillo-Hernandez, Poole, & Cook, 2000). Por su parte, la

concentración de poliaminas se ha relacionado con la protección celular al estrés oxidativo (A. Tkachenko et al., 2001; A. G. Tkachenko et al., 2012; A. G. Tkachenko & Fedotova, 2007), sin embargo, no se observa una diferencia en la sensibilidad a especies reactivas del oxígeno en la cepa PotA208.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer que el fenotipo de resistencia a altas concentraciones de gentamicina mediado por mutaciones en *E. coli* no obedece únicamente a una mutación particular, sino que se relacionaría a un conjunto de mutaciones que contribuyen a la resistencia. El presente estudio indica que el principal mecanismo de resistencia para las cepas obtenidas a través del proceso evolutivo se relacionaría con la disminución del ingreso de la gentamicina a la célula. La disminución del ingreso de estos antibióticos estaría principalmente mediada por alteraciones en el metabolismo energéticos de la célula, lo cual se relaciona también con la disminución del crecimiento bacteriano.

Conclusiones

6 Conclusiones

Respecto a los niveles máximos de resistencia a gentamicina alcanzados, no existen diferencias entre las cepas derivadas de *Escherichia coli* MG1655 y $\Delta dnaQ$ aisladas a partir del proceso evolutivo en cultivos continuos expuestos a dosis crecientes de gentamicina.

El desarrollo de resistencia a gentamicina involucra una serie de mutaciones que se generan secuencialmente en *E. coli* para dar origen a fenotipos bacterianos altamente resistentes a este antibiótico.

El mecanismo de resistencia de *E. coli* a gentamicina afecta principalmente a la síntesis proteica y al metabolismo energético de la célula, afectando, probablemente, el ingreso del antibiótico y su acción en el ribosoma.

El mecanismo de resistencia de *E. coli* a gentamicina es común para otros antibióticos pertenecientes a la familia de los aminoglicósidos, disminuyendo con esto la disponibilidad de tratamientos eficaces.

Sustituciones aminoacídicas puntuales en los genes *fusA* y *potA* generan una disminución en la sensibilidad a gentamicina.

El desarrollo de resistencia a gentamicina mediado por mutaciones afecta el *fitness* bacteriano, disminuyendo la velocidad de crecimiento y la capacidad metabólica de las cepas, sin observarse diferencias relevantes entre las cepas derivadas de los fenotipos normo e hipermutador.

La resistencia a gentamicina no se relaciona con un aumento en la resistencia a estrés oxidativo en la célula bacteriana, y el desarrollo de resistencia a este antibiótico mediado por mutaciones genera un aumento en la sensibilidad a especies reactivas del oxígeno.

Bibliografía

- Ævarson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., . . . Liljas, A. (1994). Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J*, 13(16), 3669-3677.
- Aaron, C. S., van Zeeland, A. A., Mohn, G. R., Natarajan, A. T., Knaap, A. G., Bates, A. D., & Glickman, B. W. (1980). Molecular dosimetry of the chemical mutagen ethyl methanesulfonate: quantitative comparison of mutation induction in *Escherichia coli*, V79 Chinese hamster cells and L5178Y mouse lymphoma cells, and some cytological results in vitro and in vivo. *Mutat Res*, 69(2), 201-216.
- Abraham, E. P., Newton, G. G., Crawford, K., Burton, H. S., & Hale, C. W. (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature*, 171(4347), 343.
- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., . . . Wikstrom, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol*, 7(10), 910-917.
- Acosta, M. B., Ferreira, R. C., Padilla, G., Ferreira, L. C., & Costa, S. O. (2000). Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains. *J Med Microbiol*, 49(5), 409-413.
- Acred, P., Brown, D. M., Knudsen, E. T., Rolinson, G. N., & Sutherland, R. (1967). New semi-synthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. *Nature*, 215(5096), 25-30.
- Ahmad, M. H., Rechenmacher, A., & Bock, A. (1980). Interaction between aminoglycoside uptake and ribosomal resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 18(5), 798-806.
- Aires, J. R., Kohler, T., Nikaido, H., & Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(11), 2624-2628.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*, 36(6), 697-705.
- Albesa, I., Becerra, M. C., Battan, P. C., & Paez, P. L. (2004). Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(2), 605-609.
- Ambudkar, S. V., Anantharam, V., & Maloney, P. C. (1990). UhpT, the sugar phosphate antiporter of *Escherichia coli*, functions as a monomer. *J Biol Chem*, 265(21), 12287-12292.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist Updat*, 15(3), 162-172.

- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 215-237.
- Andry, K., & Bockrath, R. C. (1974). Dihydrostreptomycin accumulation in *E. coli*. *Nature*, 251(5475), 534-536.
- Anraku, Y. (1988). Bacterial electron transport chains. *Annu Rev Biochem*, 57, 101-132.
- Anraku, Y., & Gennis, R. B. (1987). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci*, 12, 262-266.
- Arber, W. (2000). Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev*, 24(1), 1-7.
- Au, K. G., Clark, S., Miller, J. H., & Modrich, P. (1989). *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(22), 8877-8881.
- Avent, M. L., Rogers, B. A., Cheng, A. C., & Paterson, D. L. (2011). Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J*, 41(6), 441-449.
- Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exp Med*, 79(2), 137-158.
- Azucena, E., Graspas, I., & Mobashery, S. (1997). Properties of a bifunctional bacterial antibiotic resistance enzyme that catalyzes ATP-dependent 2"-phosphorylation and acetyl coenzyme A-dependent 6'-acetylation of aminoglycosides. *Journal of American Chemical Society*, 119, 2317-2318.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., . . . Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0008.
- Bajocchi, E., & Massa, L. (1960). [On a new semi-synthetic antibiotic derivative of tetracycline: hydroxy-ethyl-diethylenediaminomethyltetracycline phenoxymethylpenicillinate. Experimental and clinical data]. *Minerva Med*, 51, 2352-2354.
- Balwit, J. M., van Langevelde, P., Vann, J. M., & Proctor, R. A. (1994). Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*, 170(4), 1033-1037.

- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., & Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *The Journal of Immunology*, 130(4), 1910-1917.
- Bates, D. M., von Eiff, C., McNamara, P. J., Peters, G., Yeaman, M. R., Bayer, A. S., & Proctor, R. A. (2003). *Staphylococcus aureus* *menD* and *hemB* mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. *J Infect Dis*, 187(10), 1654-1661.
- Bayliss, C. D., Sweetman, W. A., & Moxon, E. R. (2004). Mutations in *Haemophilus influenzae* mismatch repair genes increase mutation rates of dinucleotide repeat tracts but not dinucleotide repeat-driven pilin phase variation rates. *J Bacteriol*, 186(10), 2928-2935.
- Beauclerk, A. A., & Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol*, 193(4), 661-671.
- Bitonti, A. J., McCann, P. P., & Sjoerdsma, A. (1982). Restriction of bacterial growth by inhibition of polyamine biosynthesis by using monofluoromethylornithine, difluoromethylarginine and dicyclohexylammonium sulphate. *Biochem J*, 208(2), 435-441.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., . . . Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science*, 300(5624), 1404-1409.
- Blazquez, J. (2003). Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis*, 37(9), 1201-1209.
- Blazquez, J., Morosini, M. I., Negri, M. C., Gonzalez-Leiza, M., & Baquero, F. (1995). Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(1), 145-149.
- Bongaerts, J., Zoske, S., Weidner, U., & Linden, G. (1995). Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase (nuoA-N) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators. *Mol Microbiol*, 16(3), 521-534.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., . . . Cate, J. H. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol*, 14(8), 727-732.
- Borrell, S., Teo, Y., Giardina, F., Streicher, E. M., Klopper, M., Feldmann, J., . . . Gagneux, S. (2013). Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis. *Evol Med Public Health*, 2013(1), 65-74.
- Bradley, M. D., Beach, M. B., de Koning, A. P. J., Pratt, T. S., & Osuna, R. (2007). Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology*, 153(9), 2922-2940.

- Braun, M., Bungert, S., & Friedrich, T. (1998). Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37(7), 1861-1867.
- Braun, V. (1997). Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biol Chem*, 378(8), 779-786.
- Braun, V. (2009). FhuA (TonA), the career of a protein. *J Bacteriol*, 191(11), 3431-3436.
- Braun, V., Hancock, R. E., Hantke, K., & Hartmann, A. (1976). Functional organization of the outer membrane of *Escherichia coli*: phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. *J Supramol Struct*, 5(1), 37-58.
- Bryan, L. E., Kowand, S. K., & Van Den Elzen, H. M. (1979). Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 15(1), 7-13.
- Bryan, L. E., & Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*, 23(6), 835-845.
- Bryan, L. E., & Van den Elzen, H. M. (1976). Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 9(6), 928-938.
- Buckel, P., Buchberger, A., Bock, A., & Wittmann, H. G. (1977). Alteration of ribosomal protein L6 in mutants of *Escherichia coli* resistant to gentamicin. *Mol Gen Genet*, 158(1), 47-54.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., & Ros, J. (2000). Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393-27398.
- Cabrera, M., Nghiem, Y., & Miller, J. H. (1988). *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. *J Bacteriol*, 170(11), 5405-5407.
- Cain, B. D., & Simoni, R. D. (1989). Proton translocation by the F1F0ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the a subunit. *J Biol Chem*, 264(6), 3292-3300.
- Campuzano, S., Vazquez, D., & Modolell, J. (1979). Dissociation of guanosine nucleotide-elongation factor G-ribosome complexes. *Biochemistry*, 18(8), 1570-1574.
- Carmel, G., & Coulton, J. W. (1991). Internal deletions in the FhuA receptor of *Escherichia coli* K-12 define domains of ligand interactions. *J Bacteriol*, 173(14), 4394-4403.

- Casewell, M. W., & Phillips, I. (1981). Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med*, 70(2), 459-462.
- Catic, A., Misaghi, S., Korbel, G. A., & Ploegh, H. L. (2007). ElaD, a Deubiquitinating protease expressed by *E. coli*. *PLoS ONE*, 2(4), e381.
- Cavusoglu, C., Turhan, A., Akinci, P., & Soyler, I. (2006). Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 44(7), 2338-2342.
- Cha, H. J., Jeong, J. H., Rojviriya, C., & Kim, Y. G. (2014). Structure of putrescine aminotransferase from *Escherichia coli* provides insights into the substrate specificity among class III aminotransferases. *PLoS ONE*, 9(11), e113212.
- Chattopadhyay, M. K., Keembiyehetty, C. N., Chen, W., & Tabor, H. (2015). Polyamines Stimulate the Level of the sigma38 Subunit (RpoS) of *Escherichia coli* RNA Polymerase, Resulting in the Induction of the Glutamate Decarboxylase-dependent Acid Response System via the *gadE* Regulon. *J Biol Chem*, 290(29), 17809-17821.
- Chattopadhyay, M. K., & Tabor, H. (2013). Polyamines are critical for the induction of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 288(47), 33559-33570.
- Chiba, S., Ito, K., & Akiyama, Y. (2006). The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Mol Microbiol*, 60(2), 448-457.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., . . . Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w(1118); iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80-92.
- Cisneros, G. A., Perera, L., Schaaper, R. M., Pedersen, L. C., London, R. E., Pedersen, L. G., & Darden, T. A. (2009). Reaction mechanism of the epsilon subunit of *E. coli* DNA polymerase III: insights into active site metal coordination and catalytically significant residues. *J Am Chem Soc*, 131(4), 1550-1556.
- Clements, M. O., Watson, S. P., Poole, R. K., & Foster, S. J. (1999). CtaA of *Staphylococcus aureus* is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis. *J Bacteriol*, 181(2), 501-507.
- Cohen, S. S., & Lichtenstein, J. (1960). Polyamines and ribosome structure. *J Biol Chem*, 235, 2112-2116.
- Cooper, V. S., & Lenski, R. E. (2000). The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407(6805), 736-739.

- Corbalan, N., Runti, G., Adler, C., Covaceuszach, S., Ford, R. C., Lamba, D., . . . Vincent, P. A. (2013). Functional and structural study of the dimeric inner membrane protein SbmA. *J Bacteriol*, 195(23), 5352-5361.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 41, 435-464.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., & Gunsalus, R. P. (1990). Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the fnr gene product. *J Bacteriol*, 172(11), 6333-6338.
- Courvalin, P., Carlier, C., & Collatz, E. (1980). Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol*, 143(2), 541-551.
- Cox, E. C., & Horner, D. L. (1983). Structure and coding properties of a dominant *Escherichia coli* mutator gene, *mutD*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(8), 2295-2299.
- Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA. In W. E. Hill, A. E. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger & J. R. Warner (Eds.), *The Ribosome. Structure, Function, and Evolution*. (Vol. 479-90). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Daigle, D. M., McKay, G. A., Thompson, P. R., & Wright, G. D. (1999). Aminoglycoside antibiotic phosphotransferases are also serine protein kinases. *Chem Biol*, 6(1), 11-18.
- Damper, P. D., & Epstein, W. (1981). Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 20(6), 803-808.
- Dartigalongue, C., & Raina, S. (1998). A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 17(14), 3968-3980.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of the Species*. London: John Murray.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6640-6645.
- Davis, B. D., Chen, L. L., & Tai, P. C. (1986). Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(16), 6164-6168.
- de Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. In P. M. B. Virginia L. Clark (Ed.), *Methods Enzymol* (Vol. Volume 235, pp. 386-405): Academic Press.

- Deitz, W. H., Bailey, J. H., & Froelich, E. J. (1963). In Vitro Antibacterial Properties of Nalidixic Acid, a New Drug Active against Gram-Negative Organisms. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 161, 583-587.
- Demerec, M. (1945). Production of *Staphylococcus* Strains Resistant to Various Concentrations of Penicillin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 31(1), 16-24.
- Demerec, M. (1948). Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. *J Bacteriol*, 56(1), 63-74.
- Demerec, M. (1949). Patterns of Bacterial Resistance to Penicillin, Aureomycin, and Streptomycin. *J Clin Invest*, 28(5 Pt 1), 891-893.
- Demple, B., & Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*, 63, 915-948.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., . . . Matic, I. (2002). High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol*, 184(2), 605-609.
- Didelot, X., & Maiden, M. C. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol*, 18(7), 315-322.
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88-94.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13), 6127-6145.
- Dukan, S., & Nyström, T. (1999). Oxidative Stress Defense and Deterioration of Growth-arrested *Escherichia coli* Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26027-26032.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., & Collins, J. J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 3, 91.
- Dykhuizen, D. E., & Hartl, D. L. (1983). Selection in chemostats. *Microbiol Rev*, 47(2), 150-168.
- ECDC, & EMEA. (2009). The bacterial challenge: time to react *ECDC/EMEA JOINT TECHNICAL REPORT*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Echols, H., Lu, C., & Burgers, P. M. (1983). Mutator strains of *Escherichia coli*, *mutD* and *dnaQ*, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(8), 2189-2192.

- Endriss, F., Braun, M., Killmann, H., & Braun, V. (2003). Mutant analysis of the *Escherichia coli* FhuA protein reveals sites of FhuA activity. *J Bacteriol*, 185(16), 4683-4692.
- Endriss, F., & Braun, V. (2004). Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(14), 4818-4823.
- Enne, V. I., Delsol, A. A., Davis, G. R., Hayward, S. L., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2005). Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother*, 56(3), 544-551.
- Erbe, R. W., & Leder, P. (1968). Initiation and protein synthesis: translation of di- and tri-codon messengers. *Biochem Biophys Res Commun*, 31(5), 798-803.
- Escobar, L., Perez-Martin, J., & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*, 181(20), 6223-6229.
- Ezraty, B., Vergnes, A., Banzhaf, M., Duverger, Y., Huguenot, A., Brochado, A. R., . . . Barras, F. (2013). Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science*, 340(6140), 1583-1587.
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory Of Natural Selection*. Oxford: The Clarendon Press.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226-236.
- Fling, M. E., Kopf, J., & Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 13(19), 7095-7106.
- Friedman, L., Alder, J. D., & Silverman, J. A. (2006). Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(6), 2137-2145.
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8), 2565-2571.
- Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E., & Courvalin, P. (1997). Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med*, 337(10), 677-680.

- Gao, N., Zavialov, A. V., Li, W., Sengupta, J., Valle, M., Gursky, R. P., . . . Frank, J. (2005). Mechanism for the Disassembly of the Posttermination Complex Inferred from Cryo-EM Studies. *Mol Cell*, 18(6), 663-674.
- Gao, N., Zavialov, A. V., Li, W., Sengupta, J., Valle, M., Gursky, R. P., . . . Frank, J. (2005). Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from cryo-EM studies. *Mol Cell*, 18(6), 663-674.
- Ginetti, F., Perego, M., Albertini, A. M., & Galizzi, A. (1996). *Bacillus subtilis mutS mutL* operon: identification, nucleotide sequence and mutagenesis. *Microbiology*, 142 (Pt 8), 2021-2029.
- Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., & Taddei, F. (2001). Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, 291(5513), 2606-2608.
- Glickman, B. W., & Radman, M. (1980). *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(2), 1063-1067.
- Goldstein, B. P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo)*, 67(9), 625-630.
- Goldstein, F. W., Chumpitaz, J. C., Guevara, J. M., Papadopoulou, B., Acar, J. F., & Vieu, J. F. (1986). Plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*. *J Infect Dis*, 153(2), 261-266.
- Goldstein, F. W., Labigne-Roussel, A., Gerbaud, G., Carlier, C., Collatz, E., & Courvalin, P. (1983). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid*, 10(2), 138-147.
- Goswami, A., Dikshit, P., Mishra, A., Mulherkar, S., Nukina, N., & Jana, N. R. (2006). Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(1), 184-190.
- Gottschalk, G. (1986). Nutrition of Bacteria *Bacterial Metabolism* (pp. 1-11): Springer New York.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Mol Biol Evol*, 31(1), 232-238.
- Hantke, K., & Braun, V. (1975). Membrane receptor dependent iron transport in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 49(3), 301-305.

- Herrera, G., Martinez, A., O'Connor, J. E., & Blanco, M. (2003). Functional assays of oxidative stress using genetically engineered *Escherichia coli* strains. *Curr Protoc Cytom, Chapter 11*, Unit 11 16.
- Herring, C. D., Glasner, J. D., & Blattner, F. R. (2003). Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene*, 311, 153-163.
- Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., & Wells, C. L. (2011). Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *J Surg Res*, 170(2), 302-308.
- Higashi, K., Sakamaki, Y., Herai, E., Demizu, R., Uemura, T., Saroj, S. D., . . . Igarashi, K. (2010). Identification and functions of amino acid residues in PotB and PotC involved in spermidine uptake activity. *J Biol Chem*, 285(50), 39061-39069.
- Hirokawa, G., Demeshkina, N., Iwakura, N., Kaji, H., & Kaji, A. (2006). The ribosome-recycling step: consensus or controversy? *Trends Biochem Sci*, 31(3), 143-149.
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., . . . Plesiat, P. (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4), 1371-1375.
- Holtje, J. V. (1978). Streptomycin uptake via an inducible polyamine transport system in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 86(2), 345-351.
- Horii, T., Kimura, T., Sato, K., Shibayama, K., & Ohta, M. (1999). Emergence of fosfomycin-resistant isolates of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O26. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4), 789-793.
- Hoskisson, P. A., & Hobbs, G. (2005). Continuous culture--making a comeback? *Microbiology*, 151(Pt 10), 3153-3159.
- Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S., Calhoun, M. W., Thomas, J. W., Hill, J., Lemieux, L., . . . et al. (1993). Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of site-directed mutants of bacterial cytochrome aa3 and cytochrome bo. *J Bioenerg Biomembr*, 25(2), 121-136.
- Hou, Y., Lin, Y. P., Sharer, J. D., & March, P. E. (1994). In vivo selection of conditional-lethal mutations in the gene encoding elongation factor G of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 176(1), 123-129.
- Hou, Y., Yaskowiak, E. S., & March, P. E. (1994). Carboxyl-terminal amino acid residues in elongation factor G essential for ribosome association and translocation. *J Bacteriol*, 176(22), 7038-7044.

- Humbert, R., & Altendorf, K. (1989). Defective gamma subunit of ATP synthase (F1F0) from *Escherichia coli* leads to resistance to aminoglycoside antibiotics. *J Bacteriol*, 171(3), 1435-1444.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (1996). Polyamine transport in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, 10(1), 83-97.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J*, 344 Pt 3, 633-642.
- Imamovic, L., & Sommer, M. O. (2013). Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. *Sci Transl Med*, 5(204), 204ra132.
- Imlay, J. A., & Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857), 1302-1309.
- Ingledeu, W. J., & Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 48(3), 222-271.
- Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Hoiby, N., & Wretling, B. (2009). Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 15(1), 60-66.
- Ito, T., Okuma, K., Ma, X. X., Yuzawa, H., & Hiramatsu, K. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*, 6(1), 41-52.
- Jin, D. J., & Gross, C. A. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol*, 202(1), 45-58.
- Johanson, U., & Hughes, D. (1994). Fusidic acid-resistant mutants define three regions in elongation factor G of *Salmonella typhimurium*. *Gene*, 143(1), 55-59.
- Johnson, B. A., Anker, H., & Meleney, F. L. (1945). Bacitracin: A New Antibiotic Produced by a Member of the *B. subtilis* Group. *Science*, 102(2650), 376-377.
- Junop, M. S., Yang, W., Funchain, P., Clendenin, W., & Miller, J. H. (2003). In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)*, 2(4), 387-405.
- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol*, 177(14), 3998-4008.

- Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother*, 40(5), 615-621.
- Kadurugamuwa, J. L., Clarke, A. J., & Beveridge, T. J. (1993). Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 175(18), 5798-5805.
- Kalivoda, K. A., Steenbergen, S. M., & Vimr, E. R. (2013). Control of the *Escherichia coli* Sialoregulon by Transcriptional Repressor NanR. *J Bacteriol*, 195(20), 4689-4701.
- Karatan, E., Duncan, T. R., & Watnick, P. I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol*, 187(21), 7434-7443.
- Kariyone, K., Harada, H., Kurita, M., & Takano, T. (1970). Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. I. Synthesis and chemical properties of cefazolin. *J Antibiot (Tokyo)*, 23(3), 131-136.
- Kashiwagi, K., Endo, H., Kobayashi, H., Takio, K., & Igarashi, K. (1995). Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. ATP hydrolysis by PotA protein and its association with membrane. *J Biol Chem*, 270(43), 25377-25382.
- Kashiwagi, K., Innami, A., Zenda, R., Tomitori, H., & Igarashi, K. (2002). The ATPase activity and the functional domain of PotA, a component of the spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277(27), 24212-24219.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Kobayashi, H., & Igarashi, K. (1993). Functions of *potA* and *potD* proteins in spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268(26), 19358-19363.
- Kashiwagi, K., Tsuhako, M. H., Sakata, K., Saisho, T., Igarashi, A., da Costa, S. O., & Igarashi, K. (1998). Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. *J Bacteriol*, 180(20), 5484-5488.
- Kawasaki, M., Mogi, T., & Anraku, Y. (1997). Substitutions of charged amino acid residues conserved in subunit I perturb the redox metal centers of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase. *J Biochem*, 122(2), 422-429.
- Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem*, 64, 171-200.
- Kiel, M. C., Kaji, H., & Kaji, A. (2007). Ribosome recycling: An essential process of protein synthesis. *Biochem Mol Biol Educ*, 35(1), 40-44.

- Killmann, H., Herrmann, C., Torun, A., Jung, G., & Braun, V. (2002). TonB of *Escherichia coli* activates FhuA through interaction with the beta-barrel. *Microbiology*, 148(Pt 11), 3497-3509.
- Kita, K., Kasahara, M., & Anraku, Y. (1982). Formation of a membrane potential by reconstructed liposomes made with cytochrome b562-o complex, a terminal oxidase of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem*, 257(14), 7933-7935.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., & Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res*, 12(5), 291-299.
- Kligler, I. J. (1917). The Evolution and Relationship of the Great Groups of Bacteria. *J Bacteriol*, 2(2), 165-176.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., & Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*, 37(3), 311-320.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
- Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(12), 3249-3256.
- Kwon, D. H., & Lu, C. D. (2006). Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(5), 1623-1627.
- Laible, G., Spratt, B. G., & Hakenbeck, R. (1991). Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 5(8), 1993-2002.
- Lamarck, J. B. (1809). *Philosophie zoologique* Paris.
- Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A. T., Nagaev, I., Hughes, D., & Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J Mol Biol*, 303(4), 593-603.
- Lavina, M., Pugsley, A. P., & Moreno, F. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (sbmA) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*, 132(6), 1685-1693.
- Lazar, V., Pal Singh, G., Spohn, R., Nagy, I., Horvath, B., Hrtyan, M., . . . Pal, C. (2013). Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol Syst Biol*, 9, 700.

- Leavis, H. L., Willems, R. J., Top, J., & Bonten, M. J. (2006). High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 44(3), 1059-1064.
- Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467(7311), 82-85.
- Lee, Y. J., Liu, H. Y., Lin, Y. C., Sun, K. L., Chun, C. L., & Hsueh, P. R. (2010). Fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing nosocomial infection is correlated with levofloxacin but not ciprofloxacin use. *Int J Antimicrob Agents*, 35(3), 261-264.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., & Friedrich, T. (1995). Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 230(2), 538-548.
- Lemieux, M. J., Huang, Y., & Wang, D. N. (2004). Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation. *Res Microbiol*, 155(8), 623-629.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, L., & Lu, A. L. (2003). The C - terminal domain of *Escherichia coli* MutY is involved in DNA binding and glycosylase activities. *Nucleic Acids Res*, 31(12), 3038-3049.
- Li, W., Brudecki, L. E., Senior, A. E., & Ahmad, Z. (2009). Role of α -Subunit VISIT-DG Sequence Residues Ser-347 and Gly-351 in the Catalytic Sites of *Escherichia coli* ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10747-10754.
- Liang, F. T., Aberer, E., Cinco, M., Gern, L., Hu, C. M., Lobet, Y. N., . . . Philipp, M. T. (2000). Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. *J Infect Dis*, 182(5), 1455-1462.
- Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R. K., & Cook, G. M. (2000). Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(1), 23-31.
- Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1), 11-22.

- Liu, A., Tran, L., Becket, E., Lee, K., Chinn, L., Park, E., . . . Miller, J. H. (2010). Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(4), 1393-1403.
- Liu, T. X., Xue, X. D., Wei, L. H., & Zhang, Y. M. (2009). [Study of plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes and drug-resistant transferability of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn ward]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 25(2), 98-102.
- Lopez, E., & Blazquez, J. (2009). Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8), 3411-3415.
- Lopez, E., Elez, M., Matic, I., & Blazquez, J. (2007). Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 64(1), 83-93. x
- Luria, S. E., & Human, M. L. (1952). A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol*, 64(4), 557-569.
- Ma, X., Wang, H., Deng, Y., Liu, Z., Xu, Y., Pan, X., . . . Graviss, E. A. (2006). *rpoB* Gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. *J Clin Microbiol*, 44(9), 3409-3412.
- Madigan, M. (2000). Bacterial Habitats in Extreme Environments. In J. Seckbach (Ed.), *Journey to Diverse Microbial Worlds* (Vol. 2, pp. 61-72): Springer Netherlands.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (Eds.). (2003). *Brock Biología de los Microorganismos* (10 ed.): Pearson
- Madigan, M. T., & Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol*, 2(3), 265-269.
- Maggi, N., Pasqualucci, C. R., Ballotta, R., & Sensi, P. (1966). Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy*, 11(5), 285-292.
- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(12), 3375-3380.
- Mahalakshmi, S., Sunayana, M. R., SaiSree, L., & Reddy, M. (2014). *yciM* is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 91(1), 145-157.
- Matern, Y., Barion, B., & Behrens-Kneip, S. (2010). PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*, 10, 251.

- Matsushita, K., Patel, L., & Kaback, H. R. (1984). Cytochrome o type oxidase from *Escherichia coli*. Characterization of the enzyme and mechanism of electrochemical proton gradient generation. *Biochemistry*, 23(20), 4703-4714.
- Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., & Scocchi, M. (2007). Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol Microbiol*, 66(1), 151-163.
- Mayer, K., Schuller, C., Wambutt, R., Murphy, G., Volckaert, G., Pohl, T., . . . McCombie, W. R. (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402(6763), 769-777.
- McCormick, M. H., McGuire, J. M., Pittenger, G. E., Pittenger, R. C., & Stark, W. M. (1955). Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiot Annu*, 3, 606-611.
- McGuire, J. M., Bunch, R. L., Anderson, R. C., Boaz, H. E., Flynn, E. H., Powell, H. M., & Smith, J. W. (1952). [Ilotycin, a new antibiotic]. *Schweiz Med Wochenschr*, 82(41), 1064-1065.
- McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E., & Andrews, S. C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem*, 278(32), 29478-29486.
- McNamara, P. J., & Proctor, R. A. (2000). *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents*, 14(2), 117-122.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P., & Miller, J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15), 7022-7025.
- Michaels, M. L., Tchou, J., Grollman, A. P., & Miller, J. H. (1992). A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry*, 31(45), 10964-10968.
- Miller, M. H., Edberg, S. C., Mandel, L. J., Behar, C. F., & Steigbigel, N. H. (1980). Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 18(5), 722-729.
- Misumi, M., Nishimura, T., Komai, T., & Tanaka, N. (1978). Interaction of kanamycin and related antibiotics with the large subunit of ribosomes and the inhibition of translocation. *Biochem Biophys Res Commun*, 84(2), 358-365.
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 327(6121), 389-394.

- Moore, R. A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., & Woods, D. E. (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(3), 465-470.
- Moriya, M., & Grollman, A. P. (1993). Mutations in the *mutY* gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet*, 239(1-2), 72-76.
- Morris, D. R., & Pardee, A. B. (1966). Multiple Pathways of Putrescine Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(13), 3129-3135.
- Muir, M. E., Ballesteros, M., & Wallace, B. J. (1985). Respiration rate, growth rate and the accumulation of streptomycin in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 131(10), 2573-2579.
- Muir, M. E., van Heeswyck, R. S., & Wallace, B. J. (1984). Effect of growth rate on streptomycin accumulation by *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. *J Gen Microbiol*, 130(8), 2015-2022.
- Nakae, R., & Nakae, T. (1982). Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 22(4), 554-559.
- Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M. C., Chen, H., Sinha, S. C., Yagi, T., & Ohnishi, T. (2010). The membrane subunit NuoL(ND5) is involved in the indirect proton pumping mechanism of *Escherichia coli* complex I. *J Biol Chem*, 285(50), 39070-39078.
- Nakamura, H., Saiki, K., Mogi, T., & Anraku, Y. (1997). Assignment and functional roles of the *cyoABCDE* gene products required for the *Escherichia coli* bo-type quinol oxidase. *J Biochem*, 122(2), 415-421.
- Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T., & Yoshida, H. (1989). *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(2), 254-255.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., & Fuchs, R. P. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J*, 19(22), 6259-6265.
- Nassau, P. M., Martin, S. L., Brown, R. E., Weston, A., Monsey, D., McNeil, M. R., & Duncan, K. (1996). Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. *J Bacteriol*, 178(4), 1047-1052.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*, 270(45), 26723-26726.

- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., . . . Fraser, C. M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734), 323-329.
- Nemec, A., & Maixnerova, M. (2004). [Aminoglycoside resistance of *Acinetobacter baumannii* hospital strains in the Czech Republic]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 10(5), 223-228.
- Neushul, P. (1993). Science, government, and the mass production of penicillin. *J Hist Med Allied Sci*, 48(4), 371-395.
- Newmark, K. G., O'Reilly, E. K., Pohlhaus, J. R., & Kreuzer, K. N. (2005). Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene*, 356, 69-76.
- Nghiem, Y., Cabrera, M., Cupples, C. G., & Miller, J. H. (1988). The *mutY* gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(8), 2709-2713.
- Nielsen, J., Hansen, F. G., Hoppe, J., Friedl, P., & von Meyenburg, K. (1981). The nucleotide sequence of the *atp* genes coding for the F0 subunits a, b, c and the F1 subunit delta of the membrane bound ATP synthase of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 184(1), 33-39.
- Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(20), 5803-5812.
- Nishioka, H. (1975). Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat Res*, 31(3), 185-189.
- Nishizuka, Y., & Lipmann, F. (1966). Comparison of guanosine triphosphate split and polypeptide synthesis with a purified *E. coli* system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(1), 212-219.
- Noller, H. F. (1991). Ribosomes. Drugs and the RNA world. *Nature*, 353(6342), 302-303.
- Noren, T., Akerlund, T., Wullt, M., Burman, L. G., & Unemo, M. (2007). Mutations in *fusA* associated with posttherapy fusidic acid resistance in *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(5), 1840-1843.
- Norstrom, T., Lannergard, J., & Hughes, D. (2007). Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small-colony-variant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(12), 4438-4446.
- Novikova, M., Metlitskaya, A., Datsenko, K., Kazakov, T., Kazakov, A., Wanner, B., & Severinov, K. (2007). The *Escherichia coli* Yej transporter is required for the uptake of translation inhibitor microcin C. *J Bacteriol*, 189(22), 8361-8365.

- O'Reilly, E. K., & Kreuzer, K. N. (2004). Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(21), 7149-7160.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28(3), 449-461.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., & Blazquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5469), 1251-1254.
- Paluch-Oles, J., Koziol-Montewka, M., & Magrys, A. (2009). Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Eastern Poland. *New Microbiol*, 32(2), 147-152.
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., & Oliveira, M. A. (2006). Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol*, 188(7), 2355-2363.
- Piñero-Lambeck, C., Bodelón, G., Fernández-Periáñez, R., Cuesta, A. M., Álvarez-Vallina, L., & Fernández, L. Á. (2015). Programming Controlled Adhesion of *E. coli* to Target Surfaces, Cells, and Tumors with Synthetic Adhesins. *ACS Synthetic Biology*, 4(4), 463-473.
- Post, L. E., & Nomura, M. (1980). DNA sequences from the *str* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 255(10), 4660-4666.
- Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L., & Braun, V. (1988). Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170(6), 2716-2724.
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci*, 5A, 355-367.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13(6), 151-171.
- Reha-Krantz, L. J. (2010). DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability. *Biochim Biophys Acta*, 1804(5), 1049-1063.
- Richardson, A. R., Yu, Z., Popovic, T., & Stojiljkovic, I. (2002). Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6103-6107.

- Rodriguez-Beltran, J., Tourret, J., Tenaillon, O., Lopez, E., Bourdelier, E., Costas, C., . . . Blazquez, J. (2015). High Recombinant Frequency in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *Mol Biol Evol*, 32(7), 1708-1716.
- Rodriguez-Verdugo, A., Gaut, B. S., & Tenaillon, O. (2013). Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol Biol*, 13, 50.
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. I., & Alon, U. (2002). Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16), 10555-10560.
- Rosenberg, E. Y., Ma, D., & Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol*, 182(6), 1754-1756.
- Runti, G., Lopez Ruiz Mdel, C., Stoilova, T., Hussain, R., Jennions, M., Choudhury, H. G., . . . Scocchi, M. (2013). Functional characterization of SbmA, a bacterial inner membrane transporter required for importing the antimicrobial peptide Bac7(1-35). *J Bacteriol*, 195(23), 5343-5351.
- Saiki, K., Mogi, T., Hori, H., Tsubaki, M., & Anraku, Y. (1993). Identification of the functional domains in heme O synthase. Site-directed mutagenesis studies on the *cyoE* gene of the cytochrome bo operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268(36), 26927-26934.
- Salomon, R. A., & Farias, R. N. (1993). The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J Bacteriol*, 175(23), 7741-7742.
- Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J Bacteriol*, 177(11), 3323-3325.
- Sasarman, A., Surdeanu, M., Szegli, G., Horodniceanu, T., Greceanu, V., & Dumitrescu, A. (1968). Hemin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 96(2), 570-572.
- Saurin, W., Hofnung, M., & Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*, 48(1), 22-41.
- Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Tauler, R., & Izquierdo-Ridorsa, A. (1999). Procedure for the quantitative determination of mixtures of nucleic Acid components based on multivariate spectrophotometric Acid-base titrations. *Anal Chem*, 71(1), 126-134.
- Savelsbergh, A., Matassova, N. B., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2000). Role of domains 4 and 5 in elongation factor G functions on the ribosome. *J Mol Biol*, 300(4), 951-961.

- Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P., & Sahl, H. G. (2003). Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 293(6), 427-435.
- Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66-69.
- Scheuermann, R., Tam, S., Burgers, P. M., Lu, C., & Echols, H. (1983). Identification of the epsilon-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(23), 7085-7089.
- Schmidt, L. H., & Sesler, C. L. (1943). Development of Resistance to Penicillin by Pneumococci. *Experimental Biology and Medicine*, 52(4), 353-357.
- Schneider, B. L., & Reitzer, L. (2012). Pathway and enzyme redundancy in putrescine catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 194(15), 4080-4088.
- Schofield, M. J., & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol*, 57, 579-608.
- Schwartz, R. S. (2004). Paul Ehrlich's Magic Bullets. *New England Journal of Medicine*, 350(11), 1079-1080.
- Sinha, P. K., Torres-Bacete, J., Nakamaru-Ogiso, E., Castro-Guerrero, N., Matsuno-Yagi, A., & Yagi, T. (2009). Critical roles of subunit NuoH (ND1) in the assembly of peripheral subunits with the membrane domain of *Escherichia coli* NDH-1. *J Biol Chem*, 284(15), 9814-9823.
- Sprenger, G. A., Schorken, U., Sprenger, G., & Sahm, H. (1995). Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J Bacteriol*, 177(20), 5930-5936.
- Sreedharan, S., Oram, M., Jensen, B., Peterson, L. R., & Fisher, L. M. (1990). DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(12), 7260-7262.
- Strauss, B. S., Sagher, D., & Acharya, S. (1997). Role of proofreading and mismatch repair in maintaining the stability of nucleotide repeats in DNA. *Nucleic Acids Res*, 25(4), 806-813.
- Sugiyama, S., Matsuo, Y., Maenaka, K., Vassilyev, D. G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., . . . Morikawa, K. (1996). The 1.8-Å X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein

- complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci*, 5(10), 1984-1990.
- Sugiyama, S., Vassilyev, D. G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., & Morikawa, K. (1996). Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 271(16), 9519-9525.
- Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., & Taniguchi, H. (1998). Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 36(5), 1220-1225.
- Sweetser, D., Nonet, M., & Young, R. A. (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(5), 1192-1196.
- Sykes, R. (2001). Penicillin: from discovery to product. *Bull World Health Organ*, 79, 778-779.
- Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., & Arrow, A. S. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev*, 51(4), 439-457.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*, 49(1), 81-99.
- Tabor, H., Rosenthal, S. M., & Tabor, C. W. (1958). The Biosynthesis of Spermidine and Spermine from Putrescine and Methionine. *Journal of Biological Chemistry*, 233(4), 907-914.
- Tajiri, T., Maki, H., & Sekiguchi, M. (1995). Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res*, 336(3), 257-267.
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S., . . . Tomono, K. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*, 35(4), 333-337.
- Takano, K., Nakabeppu, Y., Maki, H., Horiuchi, T., & Sekiguchi, M. (1986). Structure and function of *dnaQ* and *mutD* mutators of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 205(1), 9-13.
- Tamarit, J., Cabiscol, E., & Ros, J. (1998). Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 3027-3032.
- Tatum, E. L. (1945). X-Ray Induced Mutant Strains of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 31(8), 215-219.

- Tatum, E. L., & Lederberg, J. (1947). Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 53(6), 673-684.
- Tenaillon, O., Toupance, B., Le Nagard, H., Taddei, F., & Godelle, B. (1999). Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics*, 152(2), 485-493.
- Thi, T. D., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J. R., . . . Blázquez, J. (2011). Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 531-538.
- Thorburn, A. L. (1983). Paul Ehrlich: pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854-1915). *Br J Vener Dis*, 59(6), 404-405.
- Tikhonova, E. B., & Zgurskaya, H. I. (2004). AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *J Biol Chem*, 279(31), 32116-32124.
- Tkachenko, A., Nesterova, L., & Pshenichnov, M. (2001). The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 176(1-2), 155-157.
- Tkachenko, A. G., Akhova, A. V., Shumkov, M. S., & Nesterova, L. Y. (2012). Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res Microbiol*, 163(2), 83-91.
- Tkachenko, A. G., & Fedotova, M. V. (2007). Dependence of protective functions of *Escherichia coli* polyamines on strength of stress caused by superoxide radicals. *Biochemistry (Mosc)*, 72(1), 109-116.
- Tkachenko, A. G., & Nesterova, L. (2001). [The role of putrescine in of oxidative stress defense genes expression regulation in *Escherichia coli*]. *Mikrobiologiya*, 70(2), 168-173.
- Tkachenko, A. G., Pshenichnov, M. R., & Nesterova, L. (2001). [Putrescine as a oxidative stress protecting factor in *Escherichia coli*]. *Mikrobiologiya*, 70(4), 487-494.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.-B., Chait, R., Hartl, D. L., & Kishony, R. (2012). Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet*, 44(1), 101-105.
- Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D., & Unden, G. (1997). Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. *Eur J Biochem*, 244(1), 155-160.

- Treffers, H. P., Spinelli, V., & Belser, N. O. (1954). A Factor (or Mutator Gene) Influencing Mutation Rates in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40(11), 1064-1071.
- Troxell, B., & Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 59.
- Viveiros, M., Martins, A., Paixao, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., . . . Amaral, L. (2008). Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents*, 31(5), 458-462.
- von Eiff, C., McNamara, P., Becker, K., Bates, D., Lei, X. H., Ziman, M., . . . Proctor, R. A. (2006). Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus* *menD* and *hemB* mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol*, 188(2), 687-693.
- Walker, J. E., Saraste, M., & Gay, N. J. (1984). The unc operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim Biophys Acta*, 768(2), 164-200.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., & Hooper, D. C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(7), 2242-2248.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M., & Wagman, G. H. (1963). Gentamicin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 161, 1-7.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M., Wagman, G. H., Rosselet, J. P., Marquez, J. A., . . . Black, J. (1963). Gentamicin, a New Antibiotic Complex from *Micromonospora*. *J Med Chem*, 6, 463-464.
- Welter, R., Gu, L. Q., Yu, L., Yu, C. A., Rumbley, J., & Gennis, R. B. (1994). Identification of the ubiquinol-binding site in the cytochrome bo3-ubiquinol oxidase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 269(46), 28834-28838.
- White, P. A., McIver, C. J., & Rawlinson, W. D. (2001). Integrins and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(9), 2658-2661.
- Wilkinson, B., Foster, G., Rudd, B. A., Taylor, N. L., Blackaby, A. P., Sidebottom, P. J., . . . Staunton, J. (2000). Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chem Biol*, 7(2), 111-117.
- Winokur, P. L., Brueggemann, A., DeSalvo, D. L., Hoffmann, L., Apley, M. D., Uhlenhopp, E. K., . . . Doern, G. V. (2000). Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(10), 2777-2783.

- Wright, G. D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol*, 2(5), 499-503.
- Wright, G. D., & Thompson, P. R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci*, 4, D9-21.
- Wu, T. H., & Marinus, M. G. (1994). Dominant negative mutator mutations in the *mutS* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 176(17), 5393-5400.
- Yasui, A., & McCready, S. J. (1998). Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. *Bioessays*, 20(4), 291-297.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., . . . Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 362(9399), 1888-1893.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., . . . Igarashi, K. (2004). A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J Biol Chem*, 279(44), 46008-46013.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J*, 17(22), 6437-6448.
- Young, M. L., Bains, M., Bell, A., & Hancock, R. E. (1992). Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(11), 2566-2568.
- Zahra, M., Ferreri, M., Alkasir, R., Yin, J., Han, B., & Su, J. (2013). Isolation and Characterization of Small-Colony Variants of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol*, 51(10), 3228-3236.
- Zavialov, A. V., Hauryliuk, V. V., & Ehrenberg, M. (2005). Splitting of the posttermination ribosome into subunits by the concerted action of RRF and EF-G. *Mol Cell*, 18(6), 675-686.
- Zengel, J. M., Archer, R. H., & Lindahl, L. (1984). The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *fus* gene, coding for elongation factor G. *Nucleic Acids Res*, 12(4), 2181-2192.

Anexos

ANEXO I: Caracterización cepas resistentes a gentamicina

Cepa ancestral	Cepa aislada	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)									
		GEN	AMP	CMF	COL	CIP	FOS	TET	RIF	TRI	BrEt
MG1655	MG1655	0,25	26	4	1	0.008	0,25	0,25	4	0,5	64
	CIM5A	512	16	0,25	2	≤0.0001	≥8	0,5	16	0,25	<8
	CIM5C	512	32	2	1	0,008	≥8	1	>64	0,5	128
	CIM5F	512	32	2	1	0,008	≥8	1	>64	0,25	64
	CIM5G	512	32	0,5	2	0,008	≥8	1	>16	0,5	32
	CIM5H	512	16	0,25	2	0,008	≥8	0,5	>16	0,25	<8
	CIM5I	512	8	0,5	2	0,008	≥8	0,5	>64	0,125	<8
	CIM5K	512	32	1	1	0,008	≥8	0,5	>64	0,25	32
	CIM5M	512	32	0,5	2	0,008	≥8	0,5	>16	0,25	32
	CIM5N	512	32	1	2	0,008	≥8	1	>16	2	128
	CIM5P	512	16	≤0.125	2	≤0.0001	≥8	0,5	>16	0,125	64
	CIM5R	512	16	≤0.125	2	≤0.0001	≥8	0,25	>16	0,125	<8
	CIM5T	512	32	1	1	0,008	≥8	1	>64	0,25	64
	CIM8B	512	4	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,25	64	0,125	32
	CIM8C	512	16	1	2	0,008	≥8	0,5	>64	0,5	32
	CIM8D	512	8	1	1	0,008	≥8	0,063	64	0,25	<8
	CIM8E	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	1	>64	0,125	<8
	CIM8F	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,5	>64	0,125	<8
	CIM8G	512	4	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,125	>64	0,125	<8
	CIM8K	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,5	>64	0,25	<8
	CIM8L	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	1	>64	0,125	32
	CIM8M	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,5	>64	0,125	64
	CIM8N	512	8	≤0.125	0,5	0,008	≥8	0,5	64	0,25	<8

Tabla A1. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de MG1655. La sensibilidad de los diferentes compuestos fue evaluada mediante el método de la concentración mínima inhibitoria. Los compuestos evaluados fueron antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias: gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de etidio (BrEt).

Compuesto	Cepa				
	MG1655	CIM5H	CIM5N	CIM8C	CIM8M
α -Ciclodextrina	-	-	-	-	-
Dextrina	++	-	++	++	-
Glicogeno	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	-
Tween 80	+	-	-	-	-
N- Acetil-D-Galactosamina	-	-	-	-	-
N- Acetil-D-Glucosamina	++	++	++	-	++
Adonitol	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	++	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-
D-Celobiosa	-	-	-	-	-
i-Erytritol	-	-	-	-	-
D-Fructosa	++	-	++	-	++
L-Fucosa	++	-	+	-	-
D-Galactosa	++	-	++	++	++
Gentobiosa	-	-	-	-	-
α -D-Glucosa	++	++	++	++	++
m-Inositol	-	-	-	-	-
α -D-Lactosa	++	++	++	-	-
Lactulosa	++	-	++	-	-
Maltosa	++	++	++	-	-
D-Manitol	++	++	-	-	++
D-Manosa	++	+	++	-	+
D-Melibiosa	++	++	++	-	-
β -Metil-D-Glucosido	+	-	-	-	-
D-Psicososa	+	-	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	-
D-Ramnosa	++	-	-	-	-
D-Sorbitol	++	-	-	++	++
Sucrosa	-	-	-	-	-
D-Trealosa	++	++	++	-	++
Turanosa	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-
Ácido Pirúvico metil éster	++	++	++	-	-
Ácido Succínico mono-metil-éster	+	-	-	-	-

Continuación página siguiente

Compuesto	Cepa				
	MG1655	CIM5H	CIM5N	CIM8C	CIM8M
Ácido acético	+	-	-	-	-
Ácido cis-Aconítico	-	-	-	-	-
Ácido Cítrico	-	-	-	-	-
Ácido Fórmico	-	-	-	-	-
Lactona de ácido D-Galactónico	++	-	++	-	-
Ácido D-Galacturónico	++	-	++	++	-
Ácido D-Glucónico	++	-	++	-	-
Ácido D-Glucosaminico	-	-	-	-	-
Ácido D-Glucoronico	++	-	++	-	-
Ácido α -Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido β -Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido γ -Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido p-Hidroxi fenilacético	-	-	-	-	-
Ácido Itacónico	-	-	-	-	-
Ácido α -ceto Butirico	-	-	-	-	-
Ácido α -ceto Glutárico	++	-	-	-	-
Ácido α -ceto Valérico	-	-	-	-	-
Ácido D,L- Láctico	++	-	-	-	-
Ácido Malónico	-	-	-	-	-
Ácido Propiónico	++	-	-	-	-
Ácido Quínico	-	-	-	-	-
Ácido D-Sacárico	++	-	++	-	-
Ácido Sebatico	-	-	-	-	-
Ácido Succínico	++	-	-	-	-
Ácido Bromosuccínico	+	-	-	-	-
Ácido Succinaminico	-	-	-	-	-
Glucoronamida	++	-	-	-	-
L- Alaninamida	-	-	-	-	-
D-Alanina	++	-	-	-	-
L-Alanine	++	-	-	-	-
L-Alanil-glcina	++	-	-	-	-
L-Aspargina	++	-	-	-	-
Ácido L-Aspartico	++	-	-	-	-
Ácido L-Glutamico	-	-	-	-	-
Ácido Glicil-L-Aspártico	++	-	-	-	-
Ácido Glicil-L-Glutámico	+	-	-	-	-
L-Histidina	-	-	-	-	-
Hidroxi-L-Prolina	-	-	-	-	-
L-Leucina	-	-	-	-	-
L-Ornitina	-	-	-	-	-
L-Fenilalanina	-	-	-	-	-
L-Prolina	+	-	-	-	-

Continuación página siguiente

Compuesto	Cepa				
	MG1655	CIM5H	CIM5N	CIM8C	CIM8M
Ácido L-Pirolutámico	-	-	-	-	-
D-Serina	++	-	++	-	-
L-Serina	++	-	-	-	-
L-Treonina	-	-	-	-	-
D,L- Carnitina	-	-	-	-	-
Ácido γ -amino Butírico	-	-	-	-	-
Ácido Urocánico	-	-	-	-	-
Inosina	++	++	++	-	-
Uridina	++	-	-	-	-
Timidina	++	-	-	-	-
Feniletilamina	-	-	-	-	-
Putrescina	-	-	-	-	-
2-Aminoetanol	-	-	-	-	-
2,3-Butanodiol	-	-	-	-	-
Glicerol	++	-	++	++	++
D,L- α -Glicerol-Fosfato	+	+	++	-	-
α -D-Glucosa-1-Fosfato	++	++	++	++	++
D-Glucosa-6-Fosfato	++	-	++	-	-

Tabla A2. Perfil metabólico de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. Variaciones en el perfil metabólico de las cepas evolucionadas respecto a la cepa ancestral MG1655. La determinación de los perfiles se llevó a cabo mediante *arrays* fenotípicos Biolog GN2, los cuales permiten un análisis colorimétrico basado en las reacciones de oxido-reducción de los compuesto analizados. ++ indica coloración intensa.+ indica coloración tenue. – indica ausencia de coloración.

Actividad enzimática	Cepa				
	MG1655	Q5H	Q5N	Q8C	Q8M
β-galactosidasa	++	++	++	++	++
Arginina dehidrolasa	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	++	++	-	++	++
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-
Utilización de citrato	-	-	-	-	-
Producción de ácido sulfhídrico	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-	-	-
Desaminasa	+	-	-	-	-
Producción de indol	+	++	++	++	++
Gelatinasa	-	-	-	-	-
Fermentación/Oxidación de glucosa	+	++	++	+	++
Fermentación/ Oxidación de manitol	+	++	+	+	++
Fermentación/ Oxidación de inositol	-	-	-	-	-
Fermentación/ Oxidación desorbitol	+	-	-	+	++
Fermentación/ Oxidación de ramnosa	+	-	-	+	+
Fermentación/ Oxidación de sucrosa	-	-	-	-	-
Fermentación/ Oxidación de melibiosa	+	-	-	+	+
Fermentación/ Oxidación de amigdalina	-	-	-	-	+
Fermentación/ Oxidación de arabinosa	+	++	++	++	++

Tabla A3. Actividad enzimática de las cepas derivadas de MG1655 seleccionadas. El perfil enzimático evaluada mediante Api20E (Biomérieux). ++ indica reacción positiva de coloración intensa, + reacción positiva de coloración tenue, - reacción negativa.

Cepa ancestral	Cepa aislada	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)									
		GEN	AMP	CMF	COL	CIP	FOS	TET	RIF	TRI	BET
<i>ΔdnaQ</i>	<i>ΔdnaQ</i>	0,25	32	4	1	0,016	1	2	4	0,5	32
	CIQ1B	512	64	0,25	2	0,008	≥8	0,5	2	0,25	64
	CIQ1C	512	64	1	2	0,008	≥8	0,125	8	0,25	64
	CIQ1D	512	64	1	2	0,008	≥8	0,125	4	0,25	16
	CIQ1E	1024	64	0,25	2	0,008	≥8	0,125	4	0,25	32
	CIQ1F	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	4	0,5	64
	CIQ1G	1024	16	0,25	2	0,008	≥8	0,5	≤1	0,063	512
	CIQ1H	1024	8	1	2	0,008	≥8	0,5	≤1	0,063	32
	CIQ1I	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	4	0,25	64
	CIQ1J	1024	32	0,25	2	0,008	≥8	0,5	4	0,063	64
	CIQ1K	512	32	0,25	2	0,008	≥8	1	4	0,063	64
	CIQ1L	512	64	1	16	0,008	≥8	0,125	4	0,063	64
	CIQ1M	256	64	1	2	0,008	≥8	0,125	8	0,063	32
	CIQ1O	512	64	2	2	0,008	≥8	1	2	0,063	64
	CIQ1P	512	64	2	2	0,008	≥8	1	2	0,5	64
	CIQ1Q	1024	8	1	1	0,008	≥8	0,5	1	0,063	32
	CIQ1R	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	4	0,25	128
	CIQ1S	512	64	0,25	2	0,008	≥8	1	4	0,063	8
	CIQ1T	512	32	0,25	2	0,008	≥8	0,125	≤1	0,25	64
	CIQ2B	512	64	0,25	2	0,008	≥8	0,125	≤1	0,25	64
	CIQ2C	512	64	1	1	0,008	≥8	0,5	≤1	0,5	128
	CIQ2D	512	64	1	0,5	0,008	≥8	0,25	4	0,5	64
	CIQ2E	512	64	1	2	0,008	≥8	0,25	2	0,25	64
	CIQ2G	512	128	1	0,5	0,008	≥8	1	4	0,5	128
	CIQ2H	512	64	1	1	0,008	≥8	0,5	4	0,5	64
	CIQ2I	512	64	1	1	0,008	8	2	4	0,5	64
	CIQ2J	512	128	1	1	0,008	≥8	0,5	2	0,5	64
	CIQ2N	512	64	1	2	0,008	≥8	0,5	8	0,5	64
	CIQ2O	512	128	1	4	0,008	≥8	0,5	2	0,5	64
	CIQ2P	512	128	1	1	0,008	≥8	1	2	0,5	64
	CIQ2R	512	128	2	1	0,008	≥8	0,25	2	0,5	64
	CIQ2S	512	64	1	2	0,008	≥8	0,25	4	0,25	64
	CIQ4B	512	32	2	2	0,008	≥8	0,063	4	0,5	64
	CIQ4C	512	32	4	2	0,008	≥8	0,25	8	0,5	64
	CIQ4J	512	64	2	2	0,008	≥8	1	32	1	64
	CIQ4O	512	32	2	2	0,008	≥8	0,5	8	0,5	64
	CIQ4P	512	64	2	2	0,008	≥8	1	4	0,5	128
	CIQ4Q	512	32	2	2	0,008	≥8	0,25	4	0,5	64
	CIQ4S	512	64	2	1	0,008	≥8	0,25	8	0,25	64

Tabla A4. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas derivadas de *ΔdnaQ*. El perfil de sensibilidad fue evaluada mediante el método de la concentración mínima inhibitoria. Los compuestos evaluados fueron: gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CMF), colistina (COL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI) y bromuro de Etidio (BET).

Compuesto	Cepa				
	<i>ΔdnaQ</i>	CIQ1E	CIQ1G	CIQ2J	CIQ4J
α-ciclodextrina	-	-	-	-	-
Dextrina	++	+	+	-	++
Glicogeno	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	-
Tween 80	+	-	-	-	-
N- Acetil-D-Galactosamina	-	-	-	-	-
N- Acetil-D-Glucosamina	++	+	+	++	++
Adonitol	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	++	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-
D-Celobiosa	-	+	-	-	-
i-Erytritol	-	-	-	-	-
D-Fructosa	++	+	-	++	++
L-Fucosa	++	-	-	-	-
D-Galactosa	++	+	-	+	-
Gentobiosa	-	+	-	-	-
α-D-Glucosa	++	+	+	++	++
m-Inositol	-	-	-	-	-
α-D-Lactosa	++	+	-	++	-
Lactulosa	++	-	-	-	-
Maltosa	++	+	-	-	-
D-Manitol	++	+	+	++	++
D-Manosa	++	+	+	++	++
D-Melibiosa	++	-	-	-	-
β-metil-D-Glucósido	+	+	-	-	-
D-Psicososa	+	+	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	-
D-Ramnosa	++	-	-	-	-
D-Sorbitol	++	-	+	++	++

Continuación página siguiente

Compuesto	Cepa				
	<i>ΔdnaQ</i>	CIQ1E	CIQ1G	CIQ2J	CIQ4J
Sucrosa	-	+	-	-	-
D-Trealosa	++	+	+	++	++
Turanosa	-	+	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-
Ácido Pirúvico metil éster	++	-	-	++	++
Acido succinico mono-metil éster	+	-	-	-	-
Ácido acético	+	-	-	-	-
Ácido cis-Aconítico	-	-	-	-	-
Ácido Cítrico	-	-	-	-	-
Ácido Fórmico	-	-	-	-	-
Lactona de Ácido D-Galactónico	++	-	-	-	-
Ácido D-Galacturónico	++	-	-	-	-
Ácido D-Glucónico	++	-	+	++	++
Ácido D-Glucosaminico	-	-	-	-	-
Ácido D-Glucorónico	++	-	-	-	-
Ácido α-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido β-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido γ-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ácido p-hidroxi Fenilacetico	-	-	-	-	-
Ácido Itacónico	-	-	-	-	-
Ácido αalfa ceto Butírico	-	+	-	-	-
Ácido α-ceto Glutámico	++	-	-	-	-
Ácido α-ceto Valérico	-	+	-	-	-
Ácido D,L- Láctico	++	-	-	-	-
Ácido Malónico	-	-	-	-	-

Continuación página siguiente

Compuesto	Cepa				
	<i>ΔdnaQ</i>	CIQ1E	CIQ1G	CIQ2J	CIQ4J
Ácido Propiónico	++	-	-	-	-
Ácido Quínico	-	-	-	-	-
Ácido D-Sacárico	++	-	-	-	-
Ácido Sebático	-	-	-	-	-
Ácido Succínico	++	-	-	-	-
Ácido Bromosuccínico	+	-	-	-	-
Ácido Succinaminico	-	-	-	-	-
Glucoronamida	++	-	-	-	-
L- Alaninamida	-	-	-	-	-
D-Alanina	++	-	-	-	-
L-Alanina	++	-	-	-	-
L-Alanil-glicina	++	-	-	-	-
L-Aspargina	++	-	-	-	-
Ácido L-Aspártico	++	-	-	-	-
Ácido L-Glutámico	-	-	-	-	-
Ácido glicil-L-Aspártico	++	-	-	-	-
Ácido glicil-L- Glutámico	+	-	-	-	-
L-Histidina	-	-	-	-	-
Hidroxi-L-Prolina	-	-	-	-	-
L-Leucina	-	-	-	-	-
L-Ornitina	-	-	-	-	-
L-Fenilalanina	-	-	-	-	-
L-Prolina	+	-	-	-	-
Ácido L-Piroglutámico	-	-	-	-	-
D-Serina	++	-	-	-	-
L-Serina	++	-	-	+	+
L-Treonina	-	-	-	-	-
D,L- Carnitina	-	-	-	-	-
Ácido γ-amino Butírico	-	-	-	-	-
Ácido Urocánico	-	-	-	-	-
Inosina	++	+	-	-	-

Continuación página siguiente

Compuesto	Cepa				
	<i>ΔdnaQ</i>	CIQ1E	CIQ1G	CIQ2J	CIQ4J
Uridina	++	+	-	-	-
Timidina	++	+	-	-	-
Feniletilamina	-	-	-	-	-
Putrescina	-	-	-	-	-
2-Aminoetanol	-	-	-	-	-
2,3-Butanodiol	-	-	-	-	-
Glicerol	++	+	+	++	-
D,L- α -Glicerol Fosfato	+	-	+	-	+
α -D-Glucosa-1-Fosfato	++	-	+	++	-
D-Glucosa-6-Fosfato	++	-	-	++	-

Tabla A5. Perfil metabólico de las cepas derivadas de *ΔdnaQ* seleccionadas. Variaciones en el perfil metabólico de las cepas evolucionadas respecto a su ancestro *ΔdnaQ*. La determinación de los perfiles se llevó a cabo mediante *arrays* fenotípicos Biolog GN2, los cuales permiten un análisis colorimétrico basado en las reacciones de oxido-reducción de los compuesto analizados. ++ indica coloración intensa.+ indica coloración tenue. - indica ausencia de coloración.

Actividad enzimática	Cepa				
	$\Delta dnaQ$	CIQ1E	CIQ1G	CIQ2J	CIQ4J
β -galactosidasa	++	++	+	++	++
Arginina dehidrolasa	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	++	+	++	++	++
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-
Utilización de citrato	-	-	-	-	-
Producción de ácido sulfhídrico	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-	-	-
Desaminasa	+	+	+	+	+
Producción de indol	+	++	++	++	++
Gelatinasa	-	-	-	++	-
Fermentación/Oxidación de glucosa	+	++	++	++	++
Fermentación/ Oxidación de manitol	+	-	+	+	+
Fermentación/ Oxidación de inositol	-	-	-	-	-
Fermentación/ Oxidación desorbitol	+	+	+	+	+
Fermentación/ Oxidación de ramnosa	+	-	+	+	+
Fermentación/ Oxidación de sucrosa	-	-	-	-	-
Fermentación/ Oxidación de melibiosa	+	-	+	-	+
Fermentación/ Oxidación de amigdalina	-	-	-	-	-
Fermentación/ Oxidación de arabinosa	+	+	+	+	+

Tabla A6. Actividad enzimática de las cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ seleccionadas. El perfil enzimático evaluada mediante Api20E (Biomérieux). ++ indica reacción positiva de coloración intensa, + reacción positiva de coloración tenue, - reacción negativa.

**ANEXO II: Mutaciones no sinónimas presentes en
las cepas resistentes a gentamicina
seleccionadas y en sus ancestros.**

Las mutaciones no sinónimas presentes en las cepas CIM5H, CIM5N, CIM8C, CIM8M, CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J se detallan en el CD adjunto. Cabe destacar que en todos los casos se muestran las mutaciones presenten únicamente en las cepas resistentes, no así en sus ancestros. Las secuencias de las cepas CIM5H, CIM5N, CIM8C y CIM8M se localizan en la carpeta “Cepas derivadas de MG1655”, mientras que CIQ1E, CIQ1G, CIQ2J y CIQ4J lo hacen en la carpeta “Cepas derivadas de $\Delta dnaQ$ ”. De manera adicional, se han incluido las mutaciones no sinónimas en las cepas ancestrales de cada proceso evolutivo.

Fe de erratas: Debido al formato y al programa con el cual se han trabajado los datos, la cepa $\Delta dnaQ$ aparece en estos archivos, indistintamente, como dnaQ o $\Delta dnaQ$. No habiendo sido posible su formato en letra *cursiva* o la adición de símbolos en la nomenclatura, según sea el caso.